Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

55. BAND, 4. HEFT
MIT 101 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 3. OKTOBER 1960)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1960

Planta (Berl.)

Preis DM 26.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie" Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40. — für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

55. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft

Seite

RYCZKOWSKI, M., Changes of the osmotic value during the development of the ovule. With 34 Figures in the Text 343

RYCZKOWSKI, M., Changes of the viscosity of the central vacuolar sap during the development of the ovule. With 3 Figures in the Text 357

GIRBARDT, M., Licht- und elektronenoptische Untersuchungen an *Polystictus versicolor* (L.). Mit 14 Textabbildungen 365

ČATSKÝ, J., Zur Frage der p_H-Bestimmung bei colorimetrischen Assimilationsmessungen. Mit 6 Textabbildungen 381

FRANKE, W., Über Beziehungen der Ektodesmen zur Stoffaufnahme durch Blätter. I. Mitteilung. Beobachtungen an *Plantago major* L. Mit 32 Textabbildungen 390

RUDOLPH, H., Weitere Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. II. Mitteilung. Mit 5 Textabbildungen 424

MOHR, H., und M. WEHRUNG, Die Steuerung des Hypokotylwachstums bei den Keimlingen von *Lactuca sativa* L. durch sichtbare Strahlung. Mit 7 Textabbildungen 438

SCHWARZE, P., Über die Fraktionierung des Protoplasmas von *Phaseolus*-Arten und *Phaseolus*-Artbastarden 451

Planta 55, 343—356 (1960)

From the Department of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Cracow

CHANGES OF THE OSMOTIC VALUE DURING THE DEVELOPMENT OF THE OVULE

By

M. Ryczkowski

With 34 Figures in the Text

(Received June 28, 1960)

Studies on physico-chemical properties of the central vacuolar sap have been undertaken with regard to the fact that numerous investigators have recently taken interest in culturing whole embryos or parts of embryos isolated from the seeds at different stages of development (Cutter, jr. and Wilson 1954; Rijven 1952; Lee 1955), while some other investigators examined in vivo the course of mitosis in the nuclear endosperm (Bajer 1953, 1958; Bajer and Mole-Bajer 1954; Mole-Bajer 1958). For culturing both embryos and endosperm tissue it is indispensable to use solutions presenting properties similar to those of the natural environment constituted by the central vacuolar sap at the early developmental stages of the ovule. The problem of the central vacuole has not been widely discussed in literature as yet (Maheshwari 1950, Crocker and Barton 1953, Cinger 1958). It seems probable that this sap, like coco-nut milk can be used in some cases as a nutrient medium for cultures of various plant tissues.

It has been found in the previous work (1960a) that the osmotic value of the central vacuolar sap taken from ovules of *Haemanthus Katharinae* shows characteristic changes during the course of growth of the ovule ranging from 0.21 to 0.35 M.

The purpose of the present work was:

1. to follow the changes of the osmotic value of the central vacuolar sap during the development of the ovules in a greater number of plant species.

2. to examine the changes occuring in the structure of endosperm and in the size of the central vacuole at the same stages.

Material and Method

Ovules of *Haemanthus Katharinae* (from 2 plants), *Clivia* sp. (from 2 plants), *Haemanthus albiflos* (from 2 plants), *Asparagus officinalis* (from 1 plant), *Leucojum aestivum* (from 4 plants), *Crambe tatarica* (from 1 plant) provided the material used in this study.

Various criteria of development of ovules where adopted. The criterion for *Haemanthus Katarinae* consisted in the number of days from the day the perianth wilted, for *Clivia* sp. in the number of days from the day the perianth dropped. In both cases the fruits were provided with labels bearing the appropriate date. The size of ovules was the adopted criterion for *Haemanthus albiflos*, *Asparagus officinalis* and *Leucojum aestivum*, the size of embryos — for *Crambe tatarica*.

These various criteria of development were adopted in order to find out if it is possible to establish independently on these criteria changes, similar to those observed in *Haemanthus Katharinae* (1960a), in the osmotic value of the central vacuolar sap during the development of the ovules in various plants. The procedure elaborated for the measurement of the ovules was the same as described in the paper 1960a. Embryos were measured by means of a microscope according to Fig. 1. While measurements were performed the embryo was immersed in a drop of sap extracted from the central vacuole.

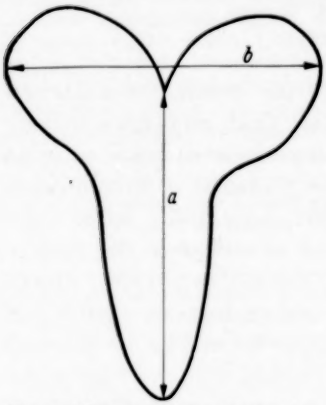


Fig. 1. Diagram of measurements of the embryo of *Crambe tatarica*. *a* length, *b* breadth

The osmotic value was determined by the thermoelectric method (ANDEL 1952, RYCZKOWSKI 1960a). The current was measured with a Zeiss ribbon galvanometer of internal resistence of about 5 Ω and sensitivity $4{,}08 \times 10^{-8}$ V scale unit. The accuracy of this method is about 0.015 M.

At the same stages, when the osmotic value was determined, a part of the material was fixed in order to examine the structure of the endosperm and the changes of the central vacuole during the development of the ovules. The modified fixation procedure of Nawaszin and Bouin Allen II was used. Dehydration was accomplished by means of alcohol by increasing its concentration from 5 to 100% by steps of 5%. Ovules were treated with xylene and imbedded in paraffin. Sections 12 μ thick were stained with hematoxyline according to Mayer's method (ROMEIS 1953) and imbedded in Canada balsam. The magnification of the optical system employed for making microphotographs were 5, 20×10, 40×10. The material for study was collected between 6.30 and 8.30 a. m. This study was performed in Summer 1959.

Results

Monocotyledonous plants

Haemanthus Katharinae. The results obtained for the osmotic value of the central vacuolar sap of *Haemanthus Katharinae* ovules are shown in Fig. 2. The osmotic value in 4—14—15 days old ovules increases rapidly from 0.2 to 0.35 M and with older ones, 15—22 days old, it remains constant on the level of 0.35 M. This value decreases, however, from 0.35 to 0.22 M in 22—35—38 days old ovules. During their further development the osmotic value remains constant being 0.22 M.

From the inspection of fixed sections it has been established that the 4—6 days old ovules possess a nuclear endosperm (Fig. 3, Fig. 4—6).

The cytoplasm in the form of a bag, much thicker at the chalaza, is attached to the cells of the nucellus; the central vacuole 1.54 × 0.74 mm in size fills the centre of the ovule. The nuclei are irregularly dispersed in the cytoplasm, most of them being located near the chalaza. Similar distributions were observed with 9—10 days old ovules. The only differences are in the shape of the bag which becomes thicker, the nuclei which become more numerous but still unequally dispersed and the increased size of the central vacuole. In the endosperm the nuclear divisions take place without formation of a cell plate in the telophase (Fig. 7). With 10—11 days old ovules the formation of cell walls between resting nuclei was observed. The formation of cell endosperm begins near the chalaza and proceeds along the walls. The size of the central vacuole increases still at this stage of development, so that in 16—17 days old ovules it fluctuates about 4.19 × 2.1 mm (Fig. 8). The development of the cell endosperm in the ovules begins at the sides of the bag and is directed towards its centre (Fig. 9, 10). In older ovules 21—22 days and 35—38 days old, a further development of the cell endosperm tissue and a gradual disparition of the central vacuole were observed (Fig. 11, 12, 13). The size of the central vacuole in 23 days old ovules was 3,8 × 1,78 mm. Ovules older than 35—38 days have no central vacuole. It is replaced by the tissue of the cellular endosperm.

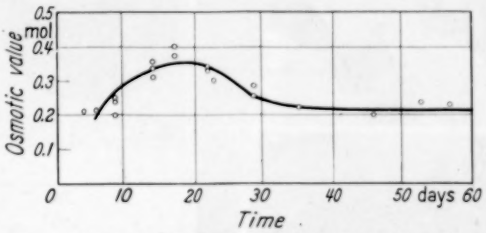


Fig. 2. *Haemanthus Katharinae.* Osmotic value of the central vacuolar sap in dependance on the age of the ovule after perianth wilted

An increase of the osmotic value of the central vacuolar sap from 0.2 to 0.35 M was found to occur in 4—14—15 days old ovules. Originally the endosperm is nuclear; in 10 days old ovules the initial stage of the formation of the cellular endosperm is observed. The size of the central vacuole increases during this period. A constant osmotic value (0,35 M), a further development of the cellular endosperm and an increase of the size of the central vacuole are characteristic of 15—22 days old ovules. A drop of osmotic value of the central vacuolar sap from 0.35 to 0.22 M, a development of cellular endosperm and a rapid disparition of the central vacuole were observed in 22—35—38 days old ovules. The osmotic value of the sap (0.21 M) extracted from the tissue of the cellular endosperm formed in ovules older than 35—38 days is more or less constant.

Clivia sp. Measurements of the osmotic value of the central vacular sap were performed on ovules taken from two plants which flowered

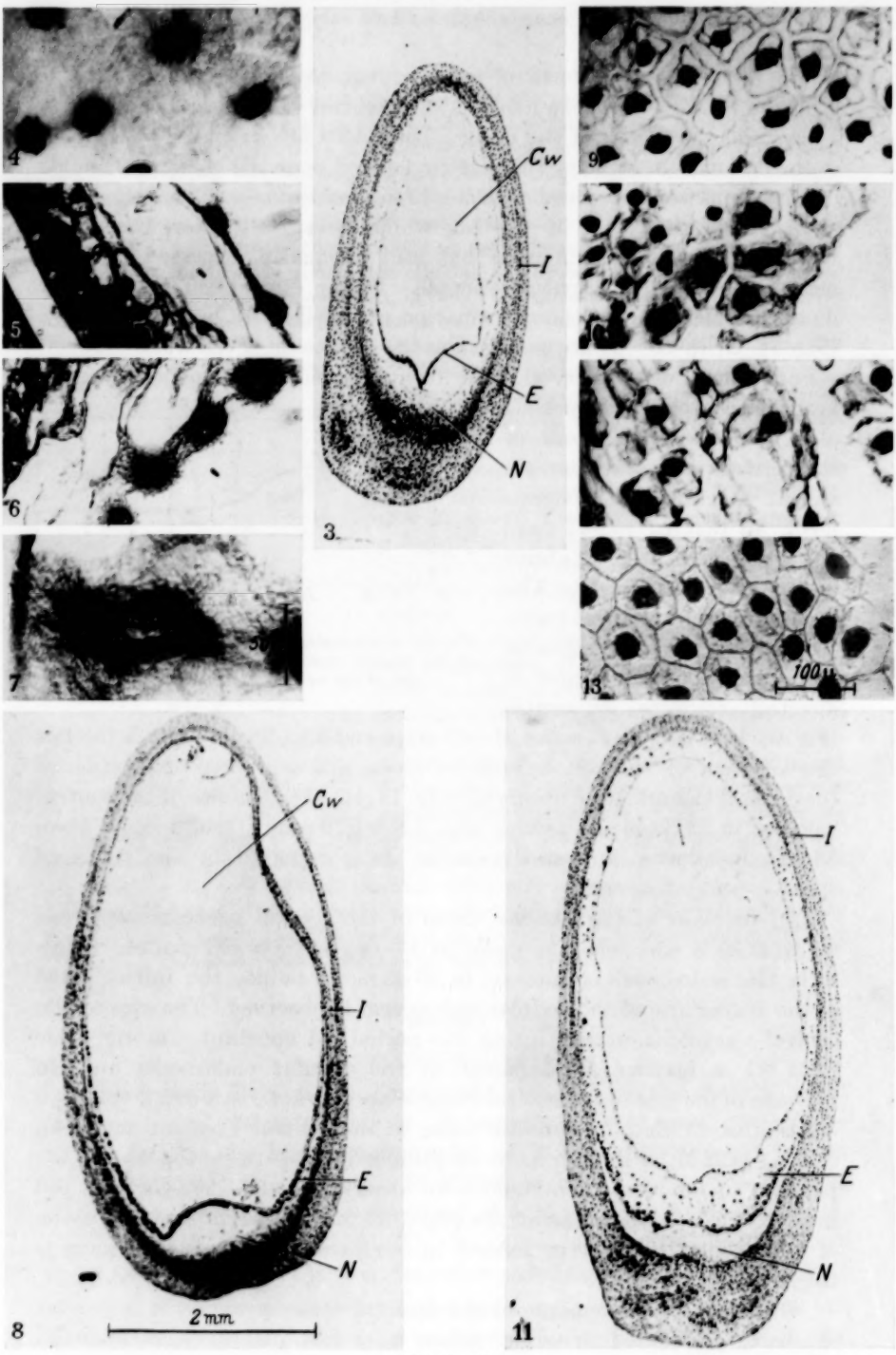


Fig. 3—13

at different periods of time. Curve I and II Fig. 14 show the results of the measurements. For fixation and staining (curve I) ovules of one plant only were used. In 7—40 days old ovules the osmotic value of the central vacuolar sap increases from 0.3 to 0.46 M (Fig. 14, curve I). A drop of osmotic value of this sap from 0.46 M to 0.35 M is characteristic of older ovules from 40—41 till about 60—65 days old. This value (0.35 M) remains constant in ovules older than 60—65 days.

It was established on stained sections that ovules in the age between 7 and 21 days possess a nuclear endosperm better developed at the chalaza. Nuclei are attached to the cells of the nucellus and unequally

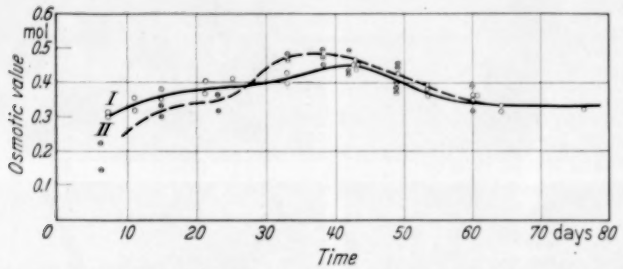


Fig. 14. *Clicia* sp. Osmotic value of the central vacuolar sap in dependance on age of the ovule, after perianth dropped

dispersed in the cytoplasm in a similar way as in ovules of *Haemanthus Katharinae*. The nuclear divisions take place without formation of cell plates (Fig. 15). The size of the central vacuole increases during this period. The formation of the cellular endosperm begins in 22—23 days old ovules. It starts at the chalase and then proceeds along the walls of the ovule towards its centre (in 30—40 days old ovules) (Fig. 16 and 17). Concomitantly the central vacuole increases in size. A further development of the endosperm tissue (Fig. 18) and a subsequent gradual decrease of the central vacuole till its complete disparition is characteristic of ovules in the age between 40—60—65 days.

It was observed that during the increase of the osmotic value of the central vacuole from 0.3 to 0.46 M in 7 to 40 days old ovules the central

Fig. 3. Section of a 6 days old ovule. *I* integuments, *E* endosperm, *N* nucellus, *CW* central vacuole

Fig. 4 and 5. 6 days old nuclear endosperm on various levels of the ovule

Fig. 6. 9 days old nuclear endosperm

Fig. 7. Telophase without a cell plate (nuclear endosperm 9 days old)

Fig. 8. Section of a 16 days old ovule

Fig. 9 and 10. Cellular endosperm 16 days old on various levels of the ovule

Fig. 11. Section of a 23 days old ovule

Fig. 12. Cellular endosperm 23 days old (central section of an ovule)

Fig. 13. Cellular endosperm 38 days old (central section of an ovule)

vacuole increases and the cellular endosperm begins to appear in 22 to 23 days old ovules. In older than 40—60—65 days old ones the osmotic value of the central vacuolar sap decreases from 0.46 to 0.35 M. A gradual decline in the size of the central vacuole, caused by the development of the cellular endosperm tissue, takes place at that time.

Leucojum aestivum. Table I shows the results of a study on the osmotic value of the central vacuole in ovules of this species. It results from the reported data that the osmotic value of the central vacuolar sap increases,

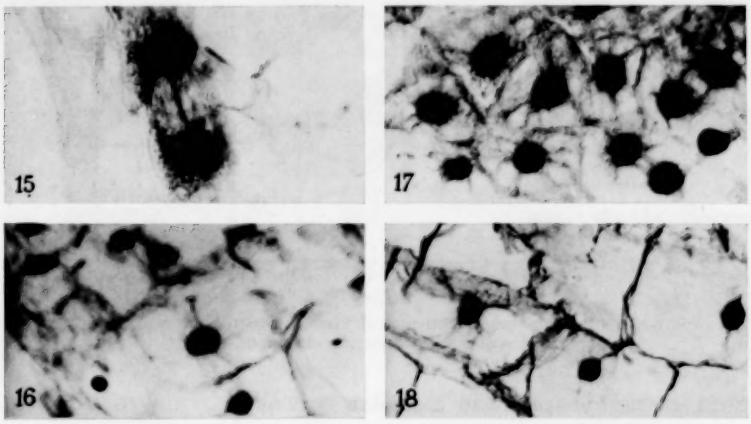


Fig. 15. *Clivia* sp. Telophase without a cell plate (nuclear endosperm 9 days old)

Fig. 16. *Clivia* sp. Cellular endosperm 35 days old (central section of an ovule)

Fig. 17. Cellular endosperm 35 days old (side section of an ovule)

Fig. 18. Endosperm 49 days old (central section of an ovule)

from 0.39 to 0.6 M during the growth of ovules 4.6×3.8 mm in size to 5.6×4.9 mm. The osmotic value decreases gradually from 0.6 to 0.356 M when the ovules attain the size 5.6×4.9 to 6.2×5.5 mm.

It was established on stained sections that ovules possess a nuclear endosperm (Fig. 19, 20) when they attain the size between $4.6 \times 3{,}8$ to 5.5×4.7 mm; at this stage the division of nuclei takes place without formation of a cell plate (Fig. 21). A greater number of nuclei in the cytoplasm of the endosperm is found at the chalase. The central vacuole of these ovules increases in size. In ovules 5.6×4.9 to 6.0×5.6 mm large a small increase of the central vacuole and the presence of cellular endosperm (Fig. 22) along the walls of the ovule were observed. A further development of the cellular endosperm tissue starting at the sides of the ovule and proceeding towards its centre (Fig. 23) and a subsequent gradual disparition of the central vacuole were found in ovules from 6.0×5.6 to 6.2×5.5 mm.

An increase of the osmotic value from 0.39 to 0.6 M takes place simultaneously with the growth of the ovules from 4.6 × 3.7 to 5.6 × 4,9 mm. The endosperm is nuclear until the ovules attain the size 5.5 × 4.7 mm and when the formation of the cellular endosperm begins. At this stage the osmotic value fluctuates about 0.6 M; the size of ovules is 5.6 × 4.9 mm and the central vacuole of the ovules attains its maximal

Table 1. *Leucojum aestivum*

Measurement results of the osmotic value of the central vacuolar sap in dependance on the size of ovule.

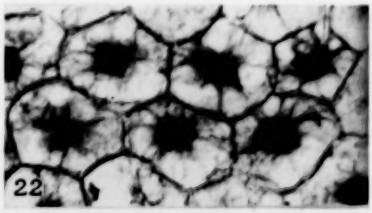
No of fruit	No of ovule	Osmotic value in M	Size of ovule in mm	Developmental stage
1	1	0.413		
	1	0.421		
	2	0.391	4.6 × 3.8	Nuclear endosperm, the central vacuole increases in size, division of nuclei takes place without formation of cell plate
	3	0.391		
2	1	0.553		
	2	0.513	5.5 × 4.7	
	2	0.528		
	3	0.538		
3	1	0.614		Initial stages of formation of the cellular endosperm developping from the sides of the ovule towards its centre, the size of the central vacuole increases slightly
	1	0.608		
	2	0.563	5.6 × 4.9	
	2	0.568		
4	1	0.600		
	1	0.596		
	1	0.593	6.0 × 5.6	
	2	0.476		
	2	0.484		
5	1	0.383		Development of the cellular endosperm. Gradual disparition of the central vacuole
	2	0.349		
	3	0.419	6.2 × 5.5	
	4	0.438		
	5	0.356		
	6	0.438		

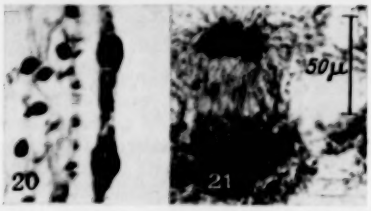
dimensions. During the further growth of ovules (from 6.0 × 5.5 to 6.2 × 5.5 mm) a decrease of the osmotic value in the central vacuolar sap from 0.6 to 0.356 M takes place. The development of the cellular endosperm in the ovules causes a dimination of the size of the central vacuole during the decrease of osmotic value.

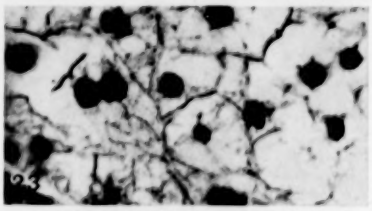
Asparagus officinalis. The results of a study on the osmotic value of the central vacuolar sap and of observations on the central vacuole and the structure of the endosperm are shown in Table 2. The osmotic value of the central vacuolar sap increases from 0.202 to 0.281 M concomitantly with the growth of ovules from 2.2 × 1.7 to 2.5 × 2.3 mm. When the size of ovules ranges from 2.5 × 2.3 to 3.0 × 2.7 mm the osmotic value remains more or less constant on the level of 0.285 M. The

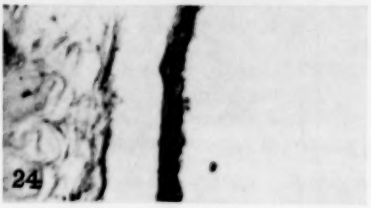
osmotic value of the central vacuolar sap in greater ovules (3.2 × 2.8 to 4.4 × 3.7 mm) decreases from 0.281 to 0.169 M.

It was observed on fixed sections that ovules of small dimensions (2.2 × 1.7 to 2.5 × 2.3 mm) possess a well developed nuclear endosperm









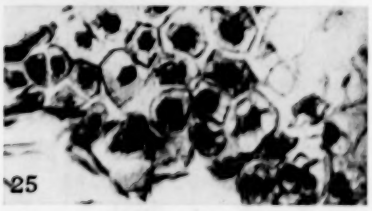


Fig. 19 and 20. *Leucojum aestivum*. Nuclear endosperm at various levels of the ovule (size of ovules from 4.6 × 3.8 to 5.5 × 4.7 mm)

Fig. 21. Telophase without a cell plate (nuclear endosperm)

Fig. 22. Cellular endosperm (central section of an ovule)

Fig. 23. Cellular endosperm (central section of an ovule, size of ovules from 6.0 × 5.6 to 6.2 × 5.5 mm)

Fig. 24. *Asparagus officinalis*. Fragment of an ovule with nuclear endosperm (central section of the ovule)

Fig. 25 and 26. Cellular endosperm on various levels of the ovule

at the chalase (Fig. 24) and their vacuole increases in size. The formation of the cellular endosperm begins when ovules attain the size 2.7 × 2.5 to 3.1 × 2.7 mm. It starts at the sides of the ovule and proceeds towards its centre (Fig. 25, 26). A slight increase in size of the central vacuole is still observed. During the further growth of the ovule (from 3.2 × 2,8

Table 2. *Asparagus officinalis*

Measurement results of the central vacuolar sap in dependance on the size of ovule

No of ovule	Osmotic value in M	Size of ovule in mm	Developmental stage
1	0.225	2.2 × 1.7	Nuclear endosperm, the size of the central vacuole increases
2	0.202	2.2 × 1.7	
3	0.225	2.2 × 1.9	
4	0.218	2.2 × 1.9	
5	0.311	2.5 × 2.3	
6	0.281	2.5 × 2.3	
7	0.285	2.7 × 2.5	Initial stages of formation of the cellular endosperm beginning from the sides of the ovule proceeding to its centre; the size of the central vacuole increases slightly
8	0.285	2.7 × 2.5	
9	0.257	2.9 × 2.5	
10	0.289	3.1 × 2.7	
11	0.281	3.2 × 2.8	Development of the cellular endosperm and a gradual disparition of the central vacuole
12	0.257	3.2 × 2.8	
13	0.257	4.0 × 2.8	
14	0.244	4.0 × 3.4	
15	0.233	4.4 × 4.0	
16	0.233	4.4 × 3.5	
17	0.195	4.4 × 3.6	
18	0.169	4.4 × 3.7	

to 4.4 × 3.7 mm) the cellular endosperm develops from the sides towards the centre of the ovules and the central vacuole gradually disappears.

With the growth of ovules, with ones ranging from 2.2 × 1.7 to 2.5 × 2.3 mm the osmotic value of the central vacuolar sap increases from 0.202 to 0.281 M, the central vacuole becomes greater and the endosperm is nuclear. In ovules 2.7 × 2.5 to 3.2 × 2.8 mm large the osmotic value remains more or less constant (0.285 M) the central vacuole still slightly increases and formation of the cellular endosperm proceeds along the walls of the ovule. It was found that the osmotic value drops from 0.281 to 0.169 M in ovules with sizes between 3.2 × 2.8 and 4.4 × 3.7 mm. The central vacuole is then gradually replaced by the growing tissue of the cellular endosperm till its final complete disparation.

Haemanthus albiflos. It results from similar measurements made in ovules of *Haemanthus albiflos* that simultaneously with the breadthwise increase of ovules from 0.7 to 3.3 mm the osmotic value increases from 0.23 to 0.39 M and remains constant till the ovule is 4.4 mm broad (Fig. 27). In ovules 4.4 to 6.4 mm broad the osmotic value of the central vacuolar sap drops from 0.39 to 0.18 M.

It was observed on stained sections that the central vacuole increases in size concomitantly with the increase of breadth of the ovule from 0.7 to 4.0 mm. It decreases when the ovule attains the breadth of 4—6.4 mm. The fixed material did not permit to make a more detailed study of structure of the endosperm during the initial growth of the ovules. In ovules 3.5 to 6.4 mm broad the endosperm is cellular.

The osmotic value increases from 0.23 to 0.39 M with the breadthwise increase of the ovules from 0.7 to 3.6 mm and remains constant till the breadth of the ovules is 4.4 mm; until this stage is reached the size of the central vacuole increases. During the further breadthwise growth of the ovule from 4.4 to 6.4 mm the osmotic value drops from 0.39 to 0.18 M and the cellular endosperm gradually replaces the central vacuole till its complete disparition.

Dicotyledonous plants

Crambe tatarica. The osmotic value of the central vacuolar sap increases from 0.49 to 0.545 M (Fig. 28) simultaneously with the lengthwise

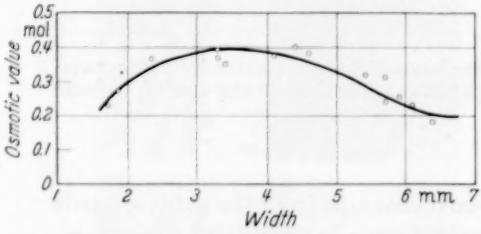


Fig. 27. *Haemanthus albiflos*. Osmotic value of the central vacuolar sap in dependance on the breadth of ovule

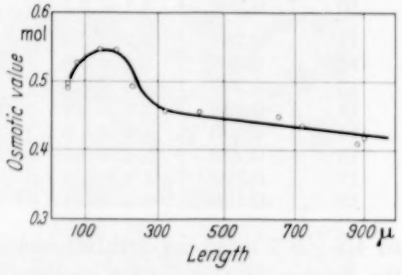


Fig. 28. *Crambe tatarica*. Osmotic value of the central vacuolar sap in dependance on the length of the embryo

increase of the embryos in ovules from 50 to 150 μ. An initially rapid drop of the osmotic value from 0.545 to 0.45 M (embryos 350 μ) takes place during the further growth of embryos from 150 to 900 μ. This drop is subsequently followed by a slow decrease of the osmotic value to 0.42 M.

It was observed on fixed material that during the lengthwise growth of the embryos in the ovules from 50 to 150 μ the endosperm is nuclear (Fig. 29—32) and the central vacuole increases in size. When the embryos attain the length of 150 to 300 μ the formation of the cellular endosperm begins near the embryo (Fig. 33) and continues subsequently along the walls of the ovule. During the further lengthwise growth of the embryos to 900 μ the tissue of the cellular endosperm increases (Fig. 34) and the central vacuole gradually disappears.

When in young ovules the embryos grow longer (about 50 to 100 μ) the osmotic value of the central vacuolar sap increases from 0.49 to 0.545 M, the endosperm is still nuclear and the size of the central vacuole increases. When the embryos attain the length of 150—300 μ the osmotic value of the central vacuolar sap decreases from 0.545 to 0.45 M, the formation of the cellular endosperm begins and the central vacuole

increases slightly. With the further growth of embryos (from 300—900 μ) a slow decrease of the osmotic value from 45 to 0.42 M and the

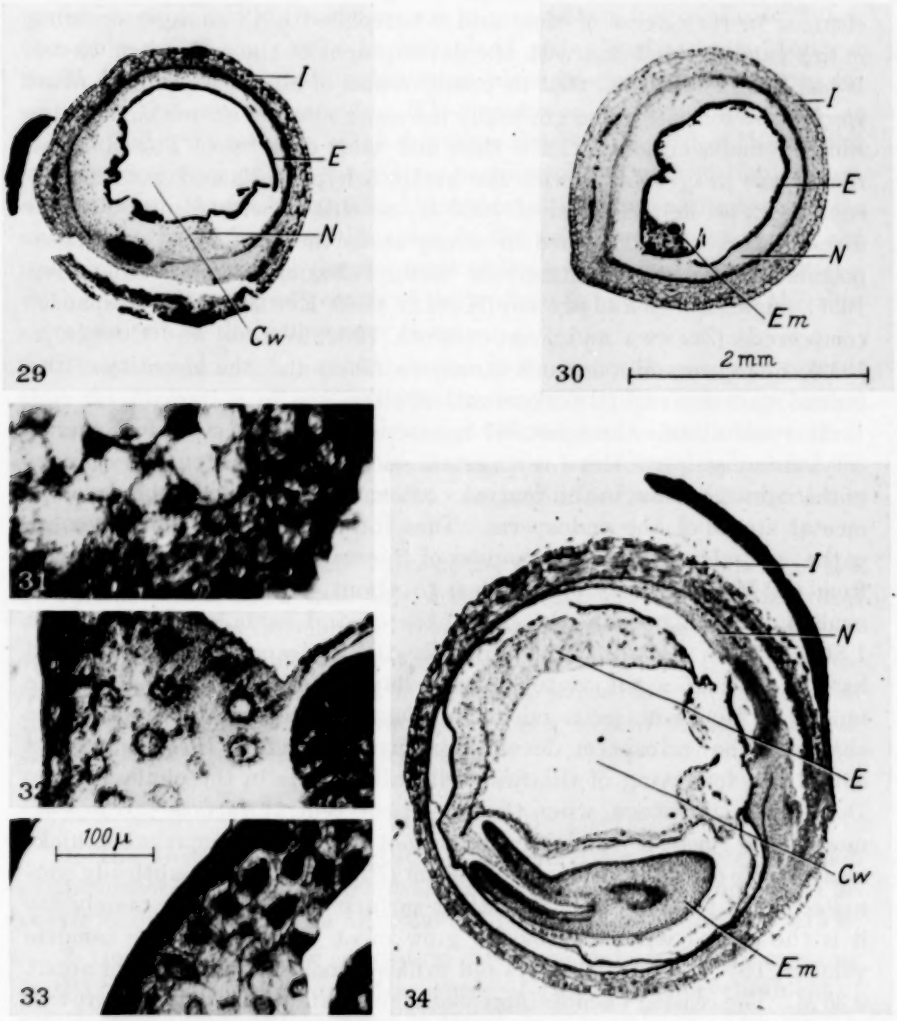


Fig. 29 and 30. *Crambe tatarica*. Section of an ovule. *I* integument, *E* nuclear endosperm, *N* nucellus, *Em* embryo, *CW* central vacuole

Fig. 31 and 32. Nuclear endosperm (central section of an ovule)

Fig. 33. Cellular endosperm near the embryo

Fig. 34. Section of an ovule with nuclear endosperm

development of the cellular endosperm tissue and embryo take place. This development causes a gradual disparition of the central vacuole.

Discussion

Studies on the osmotic value of the central vacuole in ovules of monocotyledonous and dicotyledonous plants showed that this value changes in the course of time and is correlated with changes occuring in the vacuole itself and with the development of the endosperm tissue. It has been established that in young ovules of all the examined plant species the osmotic value gradually increases to a certain maximal value which remains constant for a time and then decreases. The obtained results are in agreement with the author's hypothesis and with the results reported in the paper of 1960 (a) as well as with results of other investigators who examined in young seeds the content of such compounds as water (WELLINGTON 1956, PROKOFIEVA and HOLODOVA 1957), sugar, starch and protein (KOBLET 1940, EVENS 1941), phosphorus compounds (ZUJEWA and PORUCZIKOWA 1952, WILSON and CUTTER jr. 1952), nitrogen compounds (KOLOBKOVA 1958) and the viscosity of the central vacuolar sap (RYCZKOWSKI 1960 b).

It results from the material reported in this paper that in monocotyledonous plants there is a certain correlation between the changes of the osmotic value in the central vacuole and its size and the developmental stages of the endosperm. Thus for instance the osmotic value of the central vacuolar sap in ovules of *Haemanthus Katharinae* increases from 0.2 M (4—6 days old ovules) to about 0.35 M (16—17 days old ovules). Simultaneously the size of the central vacuole increases from 1.54×1.74 to 4.2×2.1 mm. Initially the endosperm is nuclear and has the form of a thin cytoplasmatic bag attached to the cells of the nucellus. More numerous nuclei are found in the cytoplasm near the chalase. The endosperm develops intensively and in 10—11 days old ovules the formation of the first cell walls begins in the chalasal part. During the first stage, when the size of the central vacuole inreases almost three times, the endosperm does not attain any remarkable thickness in spite of its intensive development (Fig. 8). This is doubtlessly connected with the fact that it is their surface that increases mainly for it is the period when the ovules grow most vigorously. The osmotic value in 16—17 to 21—22 days old ovules remains on the level of about 0.35 M. The central vacuole increases slightly and the rapidity of growth of the endosperm levels at that time with the rapidity of growth of the whole ovule. In older ovules of 21—22 to 35—38 days a decrease of the osmotic value from 0.35 to 0.224 M and a disparition of the central vacuole, caused by endosperm tissue growing from the sides of the ovule to its centre, was observed. The endosperm grows more vigorously at this stage of development than the ovule does, though its growth is not so intensive as it was during the previous stages.

The results and the observations of *Crambe tatarica* (dicotyledonous) deviate slightly from the type of correlation observed between the osmotic value of the central vacuolar sap and the development of the central vacuole and of the endosperm in monocotyledonous plants. When the embryos of the ovules in this plant grow lenghtwise to 150 μ a rapid drop of the osmotic value takes place in spite of an obvious increase of the central vacuole. When embryos in the ovules grow as long as 300 μ the osmotic value decreases slowly. The size of the central vacuole decreases at the same time because of the growing endosperm and embryo. It may be supposed that this initial rapid and subsequently slow decrease of the osmotic value in the central vacuolar sap is not only connected with the development of the cellular endosperm but also with an early and rapid growth of the embryo in comparison to the slow development of the endosperm tissue.

It was found with all examined plants exept for *Haemanthus albiflos* that the formation of cell walls in the nuclear endosperm is preceded by a more or less intensive increase of the osmotic value in the central vacuolar sap. The relatively scarce material and the anomalous behaviour of *Haemanthus albiflos* did not permit a final solution of this problem.

Measurements of osmotic value of the central vacuolar sap in ovules of various plants show that this value increases to a certain maximal value as the ovules develop and then it decreases to a more or less constant value. The results suggest that this type of curve presenting osmotic value may be expected in plants in which the development of their seeds is connected with the presence of a central vacuole and with the development of the endosperm tissue.

Summary

1. The thermo-electric method was applied for the determination of the osmotic value of the central vacuole in ovules of mono- and dicotyledonous plants. The accuracy of this method is about 0.015 M.

2. Observations of the endosperm structure and of changes occuring in the central vacuole during the course of growth and development of ovules were performed on fixed material.

3. It was found that there is a correlation between the osmotic value of the central vacuolar sap during the development of the ovules and the changes in size of the central vacuole, the development of the endosperm tissue and the embryo.

The author is deeply indebted to Professor F. Gorski and Dr. J. Zurzycki for their valuable critical advice in the elaboration of this work.

References

Andel, O. M. van: Determination of the osmotic value of exudation sap by means of the thermo-electric method of Baldes and Johnson. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **55**, 40—48 (1951).

Bajer, A.: Endosperm — a valuable material of experimental studies on mitosis in vivo. Acta Soc. Bot. Pol. **22**, 475—482 (1953).

Bajer, A.: Cine-micorgraphic studies on mitosis in endosperm. Exp. Cell Res. **14**, 245—256 (1958).

Bajer, A., and J. Mole-Bajer: Endosperm, material for study of the physiology of cell division. Acta Soc. Bot. Pol. **23**, 69—98 (1954).

Cinger, N. W.: Der Samen, seine Entwicklung und die physiologischen Eigenschaften, S. 106—146. Moskwa 1958.

Crocker, W., and L. V. Barton: Physiology of seeds, pp. 153—167. Waltham, Mass.: Chronica Botanica Comp. 1957.

Cutter jr., V. M., and K. S. Wilson: Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of Cocos nucifera. Bot. Gaz. **115**, 234—240 (1954).

Evans, J. W.: Changes in the biochemical composition of the corn Kernel during development. Cereal. Chem. **18**, 468—473 (1941).

Koblet, R.: Untersuchungen über die stofflichen Veränderungen in wachsenden und reifenden Weizenkorn. Ber. schweiz. bot. Ges. **50**, 99—232 (1940).

Kolobkova, E. V.: Nitrogen metabolism in ripening seeds of Zea mays. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **120**, 907—908 (1958).

Lee, Addison E.: Growth in culture of excised portions of lupine embryos. Bot. Gaz. **116—117**, 359—364 (1955).

Maheshwari, P.: An introduction to the embryology of angiosperms, pp. 221 bis 261. New York-Toronto-London: Book Comp. Inc. 1950.

Mole-Bajer, J.: Cine-micrographic analysis of c-mitosis in endosperm. Chromosoma (Berl.) **9**, 332—358 (1958).

Prokofiev, A. A., and V. P. Kholodova: Water content and maturing of seeds. Fizjol. rast. **6**, 190—196 (1959).

Rijven, A. H. G. C.: In vitro studies on the embryos of *Capsella bursa pastoris*. Acta bot. neerl. **1**, 157—200 (1952).

Romeis, B.: Mikroskopiczeskaja technika. Moskwa 1953.

Ryczkowski, M.: Observations on the osmotic value of the central vacuole sap in *Haemathus Katharinae* Bak. ovule. Bull. Acad. pol. Sci., Ser. Biol. **7**, 143 bis 148 (1960a).

Ryczkowski, M.: Investigations on viscosity and surface tension of the central vacuole sap in *Haemathus Katharinae* Bak. ovule. Bull. Acad. pol. Sci., Ser. Biol. **7**, 149—154 (1960b).

Wellington, P. S.: Studies on the Germination of cereals. Ann. Bot. **22**, 105 bis 120 (1956).

Wilson, K. S., and V. M. Cutter jr.: The distribution of acid phosphatases during development of the fruit of *Cocos nucifera*. Amer. J. Bot. **39**, 57—58 (1952).

Zujewa, L. A., u. W. I. Poruczikowa: Umwandlung von Phosphorverbindungen im reifenden Korn von Sommerweizen. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **70**, 469 (1950).

M. Ryczkowski,
Department of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Cracow, Grodzka 53 (Poland)

Planta 55, 357—364 (1960)

From the Department of Plant Physiology, Jagiellonian University, Cracow

CHANGES OF THE VISCOSITY OF THE CENTRAL VACUOLAR SAP DURING THE DEVELOPMENT OF THE OVULE

By

M. RYCZKOWSKI

With 3 Figures in the Text

(Received June 28, 1960)

It has been shown in the previous work (1960b) that the viscosity of the sap contained in the central vacuole in ovules of *Haemanthus Katharinae* differs greatly from the viscosity found for the vacuolar sap of somatic cells by WEBER (1921) and PEKAREK (1930, 1933, 1934). It has also been shown by the viscosimetric method that the viscosity of the central vacuolar sap changes in the course of development of the ovules; with 15 days old ones it is 1.071 cP, whereas, with 34 days old ones — 1.22 cP. This method, however, needs relatively great quantities of sap (about 0.6—0.7 ml), and for this reason the author was not able in his previous work (1960b) to determine the viscosity in very young (6—7 to 15 days old) ovules of *Haemanthus Katharinae*, as well as in ovules of plants, which ovules are much smaller than these of *Haemanthus Katharinae*.

The purpose of this work is to extend the study on the viscosity of the central vacuolar sap over ovules from their possibly earliest developmental stages till the very late stages when the isolation fo sap becomes impossible. This aim could only be achieved by the method of PEKAREK (1930, 1931).

More particularly it was the purpose of the present work:

1. to follow the changes occuring in the viscosity of the sap of the central vacuole in ovules of *Haemanthus Katharinae* during their course of development from the 6 or 7 day to the 35 day;

2. to make similar observations on the viscosity of the central vacuolar sap of other plant species.

Material and Method

The ovules of *Haemanthus Katharinae*, *Clivia* sp., *Asparagus officinalis* and *Crambe tatarica* provided the material used in this study. Different criteria were adopted for the characterisation of the developmental stages of the ovules. In the case of *Haemanthus Katharinae* the criterion consisted in the number of days from the day the perianth wilted to the day the ovules were collected for examination; for *Clicia* sp. — in the number of days from the moment the perianth dropped. In both cases the fruits were provided with labels bearing the appropriate date. The

corresponding criteria for *Asparagus officinalis* and *Crambe tatarica* were, respectively, the size of the ovules and the embryos.

The method described in a previous paper (1960a) was employed for the measurements of ovules, whereas, embryos were measured by means of a microscope immediately after the sap had been squeezed out (Fig. 1). While measurements were performed the embryo was immersed in a drop of sap extracted from the central vacuole.

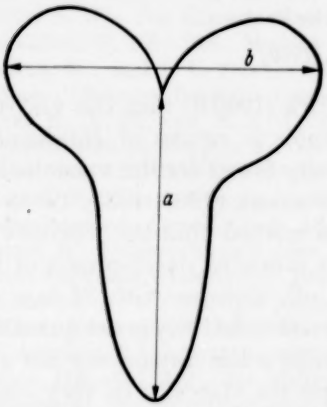


Fig. 1. Diagram of measurements of the embryo of *Crambe tatarica*. *a* length, *b* breadth

The viscosity of the central vacuolar sap was computed according to the following formula:

$$\eta = \frac{R}{N} \cdot T \cdot \frac{t}{3\pi\ a l^2 n} \qquad (1)$$

where

T = absolute temperature 298°C;
t = time interval for the total number of passages of an individual particle in sec;
l = distance between two neighbouring lines on the occular ($l^2 = 11.1 \times 10^{-8}$) cm;
n = number of passages of an individual particle;
a = radius of the particle in cm;

$$\frac{R}{N} \cdot \frac{1}{3\pi} = 0.145 \times 10^{-16}$$

Table 1.

Results of measurements of the viscosity of water in temperature, $T = 298 \pm 0.5°$ C

No	t	$a \cdot 10^{-5}$	n	$\eta \cdot 10^{-3}$
1	56.0	3.5	6	10.38053
2	59.4	4.0	7	8.25809
3	52,4	3.5	8	7.28491
4	48.5	3.5	7	7.70596
5	86.5	4.0	10	8.41796
6	102.0	4.5	10	8.82345
7	123.8	4.75	10	10.14561
8	64.8	3.5	7	10.29579
9	86.4	4.0	10	8.40823
10	89.4	4.0	9	9.66687
11	66.4	3.75	6	11.48779
12	97.7	4.0	9	10.56436
13	48.2	3.5	7	7.65829
14	88.7	4.0	10	8.63206
15	80.6	4.0	8	9.80474
16	82.7	4.5	9	7.94879
17	57.0	3.75	7	8.53399
18	71.4	3.5	7	11.28089
19	93.5	4.0	12	7.58266
20	45.8	4.0	5	8.91428
21	94.5	4.0	9	10.21834
22	76.3	3.75	11	7.20032
23	77.0	4.0	9	8.32605
24	81.3	4.0	9	8.79101
25	91.8	4.0	9	9.92639
26	73.5	4.0	6	11.92139
27	65.0	4.0	8	7.90705
28	90.0	3.75	10	9.34248
29	104.8	3.75	15	7.25253
30	39.0	3.5	8	5.42198
				$\bar{\eta} = 8.93696$
				$= 0.8937$ cP

t = time interval for the total number of passages of a given particle in sec; $a \times 10^{-5}$ = radius of the particle in cm; n = number of passages of the given particle; $\eta \times 10^{-3}$ = absolute viscosity in cgs units; $\bar{\eta}$ = absolute viscosity, mean value.

The substitution of $l^2 = 11.1 \times 10^{-8}$ and $T = 298°$ into the first formula and some transformations lead to the second formula, which was applied to compute the viscosity.

$$\eta = 3{,}8927 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{t}{a n} \qquad (2)$$

For its determination a drop of sap extracted from the central vacuole was placed with a sterile pipette on a clean slide glass. A bit of crushed cambodge (gamboge) was immediately brought in with a glass needle, the drop was stirred and quickly covered with a clean cover glass; its edges were smeared with vaseline mixed with a bit of paraffin. The movements of the particles were observed within 2—3 hours following the preparation of the slides.

The Zeiss microscope, magnification 15×90, was provided with an occular equipped with a double scale formed by a series of parallel lines. The distances separating two lines were 3.333 μ and 0.8 μ respectively. The latter scale was used to measure the diameter of the particles. The measurements were made at $25 \pm 0.5°$. Preliminary tests were carried out with water at two different temperatures: $T = 294 \pm 0.5°$ C and $T = 298 \pm 0.5°$ C. In the first case the mean of 41 measurements is 0.9755 cP $\pm$ 1 % and it only slightly differs from the value 0.9810 cP found in physical tables. The results of measurements carried out at $T = 298°$ C are presented in table 1. The mean is 0.8936 cP and is almost identical with 0.8937 cP i.e. the value given by the physical tables.

Results

Monocotyledonous plants

Haemanthus Katharinae. The principal results are presented in the graph in Fig. 2. (Every point in this graph and in graph 3 for *Clivia* sp. — corresponds to a mean of 10—20 measurements made on one slide.)

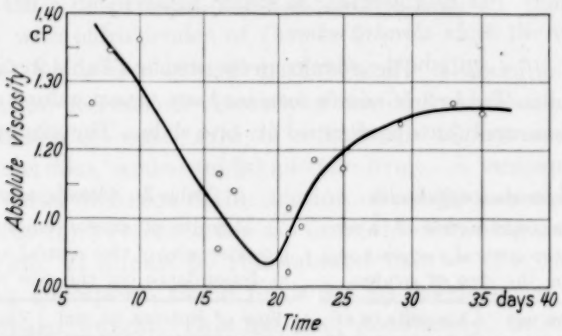


Fig. 2. *Haemanthus Katharinae.* Absolute viscosity of the central vacuolar sap in dependance on the age of ovule after perianth wilted

It results out of graph 2 that the viscosity of the sap of the central vacuole with 8—10 days old ovules fluctuates about 1.35 cP and decreases with the age of ovules, so that the viscosity of the central vacuolar sap with 16 days old ovules attains only obout 1.05—1.16 cP and with 19 days old ones it drops to its minimal value i.e. about 1.03 cP. From this moment a rapid increase of viscosity of the central vacuolar sap begins and with 21 days old ovules the viscosity attains already a value between 1.075—1.115 cP, and with 25 days old ones — 1.175 cP. With still older ones (33—35 days) this value is about 1.26 cP and remains constant.

Clivia sp. The results obtained with *Clivia sp.* are shown in Fig. 3. The viscosity of the central vacuolar sap with 6 days old ovules attains 1.37 cP and decreases with the age of ovules. The viscosity with 15 to 16 days old ovules fluctuates about 1.12 cP and with 19 days old ones its value proves to be the lowest one, i.e. 1.05 cP. This value increases considerably during the course of development of the ovules. Thus with 25 days old ovules it attains the value 1.2 cP and with 32 days old ones — 1.26 cP. This value is characteristic of 45 days old ovules as well.

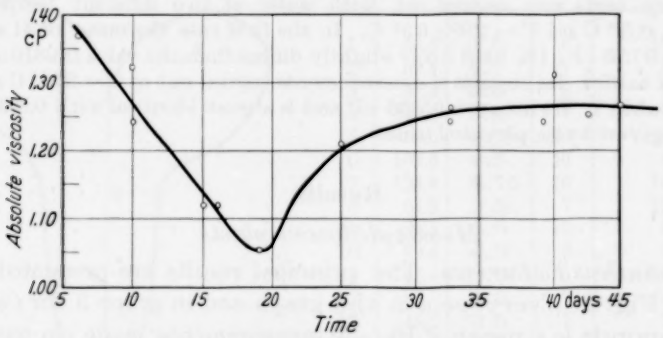


Fig. 3. *Clivia* sp. Absolute viscosity of the central vacuolar sap in dependance of the age of ovule, after perianth dropped

Asparagus officinalis. The results presented in Table 2 *(Asparagus officinalis)* and in Table 3 *(Crambe tatarica)* are mean values calculated from 10—20 measurements performed on one slide. The viscosity of the central vacuolar sap of ovules of *Asparagus officinalis* shows during the course of their development similar changes as in above described plants. It has been established that for younger ovules (2.5—2.6 × 2.5—2.2 mm) it varies from 1.248 cP to 1.355 cP (Table 2); it decreases then with the

Table 2. *Asparagus officinalis*

Results of measurements of absolute viscosity of the central vacuolar sap in dependance on the size of ovules.

Size of ovules in mm	Viscosity in cP
2.5 × 2.5	1.2487
2.6 × 2.2	1.3558
3.4 × 2.7	1.0374
3.7 × 3.3	1.1201
3.8 × 3.3	1.0610
4.1 × 3.3	1.0679
4.4 × 3.3	1.2868
4.4 × 3.4	1.3080

Table 3. *Crambe tatarica*

Results of measurements of absolute viscosity of the central vacuolar sap in dependance on the size of embryos.

Size of embryos in mm	Viscosity in cP
0.026 × 0.033	1.2912
0.035 × 0.040	1.2249
0.040 × 0.055	1.0168
0.067 × 0.077	1.0795
0.067 × 0.097	1.0653
0.240 × 0.150	1.1154
0.375 × 0.250	1.0966
0.593 × 0.393	1.2438
0.655 × 0.430	1.3635
0.760 × 0.460	1.4037

growth of the ovules and the viscosity of full grown ones (3.4—4.1 × 2.7—3.4 mm in size) attains the value 1.037—1.12 cP. With still older ones (4.4 × 3.4 mm in size) it increases to 1.286—1.308 cP.

Dicotyledonous plants

Crambe tatarica. The viscosity of the central vacuolar sap of young ovules, with embryos 0.026 × 0.033 mm and 0.035 × 0.04 mm big varies from 1.291 to 1.224 cP (Table 3). The lowest value of viscosity 1.016 cP was found in older ovules in which the embryos are greater in size (0.04 × 0.055 mm). A gradual increase of viscosity from 1.115 cP (size of embryos 0.24 × 0.15 mm) to 1.402 cP (size of embryos 0.76 × 0.46 mm) was observed with ovules of still greater embryos.

Discussion

It results from the measurements of viscosity of the central vacuolar sap presented here that this value undergoes some characteristic changes during the course of development of ovules taken from different plants. A gradual decrease of viscosity to a certain minimal value is characteristic of younger ovules; it is followed by a rapid increase of viscosity till a determined value is reached and this remains constant. It is only with older ovules of *Crambe tatarica* that the viscosity of the central vacuolar sap shows an increasing tendency.

The initial decrease of viscosity of the central vacuolar sap is caused by a diffusion of water and of compounds of low molecular weight (monosaccharides, amino acids) into the ovule. A consequence resulting from the water diffusion is the dilution of compounds of high molecular weight (protein), present in the sap since the early stages of development of the ovule. It should be remembered that at this time the rapidly developing endosperm tissue needs for its development compounds of high molecular weight. This has also, doubtlessly, an influence on the decrease of viscosity of the central vacuolar sap. A this stage of development the migration of water and of compounds of low molecular weight from the vegetative organs into the ovules exceeds the amounts of synthetized proteins stored in the central vacuolar sap. The dilution and utilization of proteins are highest when the viscosity of the central vacuolar sap attains its minimal value. It is difficult to establish which of these two factors is decisive at this stage. One may, however, assume that these two processes (of dilution and utilization of protein) do not occur, at this stage of development of the ovules, with the same intensity.

The viscosity of the central vacuolar sap increases quickly with the further development of the ovules and in a short time a constant value

is attained. This is most probably connected with an increase in concentration of such compounds as proteins and polisaccharides in the central vacuolar sap. It may be supposed that, at this period, the dilution does not play any essential part and the utilization of protein for building endosperm tissue is probably also less intensive than during the earlier development stages of the ovule, whereas, the process of synthesis of protein and polisaccharide compounds is predominant.

The results obtained by investigators who have worked on similar problems are in agreement with this interpretation as well as with results obtained for the viscosity of the central vacuolar sap. WELLINGTON (1956) established that the water contents in wheat grains 2—5 weeks after anthesis increased from 16 to 27 mg per one grain and then gradually dropped. Similar results were obtained by PROKOFIEV and KHOLODOVA (1959). They found that the water content of 1000 poppy-seeds 3—6 days after flowering increased from 200 to about 770 mg and then decreased at later stages. SEMENENKO (1957) who examined nucleic acids in ripening wheat grains observed that the quantity of these compounds, computed for 1 g dry weight is twice as big some days after blooming than at the early developmental stages. KOBLET (1940) established that the content of sugar in wheat grains was about 2.2 g per 1 kg on the 13th day after the beginning of bloom and decreased gradually till on the 35th day it was only 0.9—1.2 g per 1 kg; whereas the content of protein and starch increased greatly at the same time. EVENS (1941) examined the chemical composition of corn grains at the stage of development after silking and found that the content of reducing sugars computed for dry weight attains 9.04% on the 15th day. From this day on it gradually decreases till on the 57th day it drops to 3.07%. The content of starch is 22.8% on the 15th day and increases rapidly with the age of grains. Thus on the 36th day it attains a constant value, 71,8%. KOLOBKOVA (1958) who examined the nitrogen compounds in ripening grains of corn, found that the content of amino nitrogen calculated for 1 endosperm at a very early stage is 0.31 mg and then it drops to 0.03 mg at full ripeness. The corresponding contents of protein nitrogen calculated for 1 endosperm are 1.25 mg and 3.69—2.54 mg.

The results of the author's examination on osmotic value of the central vacuolar sap of ovules observed in monocotyledonous and dicotyledonous plants (1960a and c) are in agreement with the results of studies on the viscosity of the central vacuolar sap. Observations on the osmotic value show that a decrease of viscosity in the central vacuolar sap of young ovules occurs at about the same time when their osmotic value increases. The maximal osmotic value is attained at the moment the viscosity drops to its minimal value. A decrease of

osmotic value and an in time corresponding increase of viscosity to a constant value is characteristic of ovules at their later stages of development.

The author's (1960b) previous results obtained in a study on the viscosity of the central vacuolar sap of 15—34 days old ovules of *Haemanthus Katharinae* performed by the viscosimetric method support the results presented in this paper. A slight difference between these results can be explained easily by the fact that the values of viscosity obtained in the first case are mean values from numerous (40—25) ovules, whereas, in the second case the values are means of measurements made on the sap collected from individual ovules at different stages of their development. Another cause of this difference is, doubtlessly, a certain variability in the time of blooming and fruiting.

Summary

1. The method of PEKAREK (1930, 1931) was employed to determine the viscosity of the central vacuolar sap of ovules of monocotyledonous and dicotyledonous plants. The accuracy of this method is about 1%.

2. It has been established that the viscosity of the central vacuolar sap of ovules in the examined plants varies between 1.37 cP to 1.4 cP and shows characteristic changes during the course of their development. These changes are, doubtlessly, connected with a migration of water, monosaccharides and amino acids from vegetative organs into the ovule and subsequently with synthesis of such compounds as polisaccharides and protein in the endosperm.

The author wishes to express his most sincere gratitude to Professor F. GÓRSKI and Doctor J. ZURZYCKI for their kind help in the course of this work.

References

EVANS, J. W.: Changes in the biochemical composition of the corn kernel during development. Cereal. Chem. **18**, 468—473 (1941).

KOBLET, R.: Untersuchungen über die stofflichen Veränderungen in wachsenden und reifenden Weizenkorn. Ber. schweiz. bot. Ges. **50**, 99—232 (1940).

KOLOBKOVA, E. V.: Nitrogen metabolism in ripening seeds of *Zea mays*. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **120**, 907—910 (1958).

PEKAREK, J.: Absolute Viskositätsmessung mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. I. Prinzip der Methode, Voraussetzungen, Fehlerquellen der Messungen. Protoplasma **10**, 510—532 (1930).

PEKAREK, J.: II. Viskositätsbestimmung des Zellsaftes der Epidermiszellen von *Allium cepa* und des Amöben-Protoplasmas. Protoplasma **11**, 19—48 (1930).

PEKAREK, J.: III. (a) Viskositätsmessungen an distilliertem Wasser. (b) Viskositätsmessungen an Glizerin-Wassergemischen. (c) Viskositätsmessungen des Zellsaftes der Protonemazellen von *Leptobryum piriforme*. Protoplasma **13**, 637 bis 665 (1931).

PEKAREK, J.: V. Plasmolise und Zellsaftviskosität. Protoplasma **18**, 1—53 (1933).

Pekarek, J.: Der Einfluß der Temperatur auf die Zellsaftviskosität. Protoplasma **20**, 251—278 (1933).

Prokofiev, A. A., and V. P. Kholodova: Water content and maturing of seeds. Fizjol. rast. **6**, 190—196 (1959).

Ryczkowski, M.: Observations on the osmotic value of the central vacuole sap in *Haemanthus Katharinae* Bak. ovule. Bull. Acad. pol. Scie., Ser. Biol. **7**, 143—148 (1960a).

Ryczkowski, M.: Investigations on viscosity and surface tension of the central vacuole sap in *Haemanthus Katharinae* Bak. ovule. Bull. Acad. pol. Sci., Ser. Biol. **7**, 149—154 (1960b).

Ryczkowski, M.: Changes of the osmotic value during the development of the ovule. Planta (Berl.) **55**, 343—356 (1960c).

Semenenko, G. I.: Concerning the transformation of nucleic acids in germinating and maturing seeds. Fizjol. rast. **4**, 332—337 (1957).

Weber, F.: Die Zellsaftviskosität lebender Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **39**, 188—192 (1921).

Wellington, P. S.: Studies on the germination of cereales. Ann. Bot. **22**, 105—120 (1956).

M. Ryczkowski,
Department of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences
Cracow, Grodzka 53 (Poland)

Planta 55, 365—380 (1960)

Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. H. Knöll)

LICHT- UND ELEKTRONENOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN AN *POLYSTICTUS VERSICOLOR* (L.)

VI. DER NUCLEOLUS-FORMENWANDEL. EIN BEITRAG ZUR FRAGE DER KERNBEWEGUNG*

Von

Manfred Girbardt

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Juli 1960)

Einleitung

Lebendbeobachtungen an verschiedenen Objekten zeigen, daß der im fixierten Zustand meist kugelige bis ellipsoide Nucleolus häufigen Gestaltsänderungen unterworfen ist [Linsbauer (1932), Lenoir (1932), Hämmerling (1931)]. Die Formenvarianz wird meist als Folge amöboider Beweglichkeit gewertet [Vincent (1955), Brachet (1957)] und der Nucleolarsubstanz solartige Konsistenz zugesprochen.

Gelegentlich sind Nucleolen beschrieben worden, die durch bevorzugte Lagerung an einem Pol der Kerne ausgezeichnet sind [Němec (1931), Geitler (1932), Heim (1954)]. In Basidien mehrerer Hymenomyceten beschreibt Ruhland (1901) „Kometenkerne". In diesen geht vom Nucleolus ein Schweif aus, der spitz an der Kernmembran endet. Auch bei anderen Pilzarten sind solche „Kometenkerne" gefunden worden [Lagerheim (1900), Maire (1902, 1905), Guilliermond (1905), Müller (1924)]. Nach Allen (1936) laufen die Nucleolen von *Erysiphe polygoni* in einem feinen Faden aus, dessen knopfiges Ende ins Plasma ragen soll. Allen folgert daraus: "It may be, that this nucleolar apparatus is a mechanism for locomotion."

Frederic et al. (1952) können an Fibroblastenkulturen mikrokinematographisch zeigen, daß der Nucleolus häufig tropfig ausgezogen ist. Zwar kann eine Verbindung zur Kernmembran nicht nachgewiesen werden, der Nucleolus bewegt sich jedoch meist zu einer Stelle der Kernmembran, an der außen Mitochondrien haften. Es wird angenommen, daß ein vorübergehender Kontakt zwischen Mitochondrien und Nucleolus hergestellt wird und ein Substanzaustausch stattfinden kann.

Der auch von anderen beobachtete Kontakt des Nucleolus mit der Kernmembran wird meist in Zusammenhang gebracht mit Extrusionsvorgängen [Ludford (1925), Saguchi (1927), Kusano (1930), Berg (1932), Webb (1935)]. Nach

* Herrn Prof. Dr. Theodor Herzog zum 80. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

ALTMANN (1949, 1952) soll die Abgabe der Nucleolussubstanz als Ausschleusung vor sich gehen, eine Vorstellung, die von zahlreichen Autoren übernommen wird [LETTRÉ u. SIEBS (1954a und b), WOLL (1956)]. EHRET et al. (1955) sowie HORSTMANN et al. (1957) zeigen elektronenoptische Bilder, die eine Abgabe geformter Nucleolussubstanz durch die Kernmembran wahrscheinlich werden lassen.

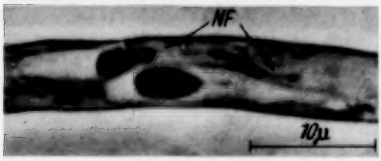


Abb. 1. *Polystictus versicolor:* Interphasekerne mit fadenförmig (*NF*) ausgezogenen Nucleolen. — Phako lebend. Etwa 1665:1

Gelegentlich wird die Frage erörtert, ob zwischen dem Formenwechsel des Nucleolus' und der Kernbewegung ein Zusammenhang besteht. Nach MATTHEWS (1932) sollen im Nucleolus Körperchen entstehen, die als motorische Zentren wirken können. Solche „Nucleolocentrosomen" werden auch in der älteren Protisten-Literatur erwähnt [vgl. SCHUSSNIG (1953)]. In den Zoosporen von *Jaraja salicis* ist nach NĚMEC (1931) der Nucleolus mit der spitz ausgezogenen Kernmembran verbunden. An der Verbindungsstelle liegt ein färbbares Körnchen, das nach Meinung von NĚMEC aus dem Nucleolus entstanden ist. Ähnlich sind die Angaben von NISHIMURA (1926) für die Kerne von *Plasmopara Halstedtii*. Meist begnügen sich die Autoren mit der Angabe, daß die Interphasekerne zahlreicher Pilzarten in Richtung des „Mikrosoms" verschmälert sind, also Birnen- oder Tropfenform annehmen [MAIRE (1902, 1905), EVANS (1907), BENSAUDE (1918), LINDEGREN (1951), LINDEGREN et al. (1954), SCHMID (1958)].

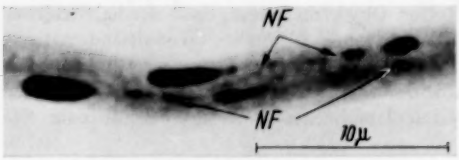


Abb. 2. *Polystictus versicolor:* Nucleolen mit fädigen Fortsätzen (*NF*). — Flemming-Formol-Fixierung. Eisenhämatoxylin. Etwa 2500:1

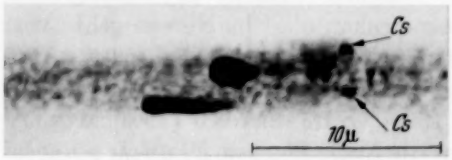


Abb. 3. *Polystictus versicolor:* Am Ende der Nucleolarfäden beider Interphasekerne befinden sich knopfige, centrosomenähnliche Verdickungen (*cs*). — Fixierung: stark. Flemming, Eisenhämatoxylin. Etwa 2500:1

Ausgangspunkt für die Analyse des Nucleolusverhaltens von *Polystictus versicolor* war die Beobachtung, daß besonders am rasch wandernden Kern der Nucleolus bevorzugt in Tropfenform auftritt. Dabei läuft das Ende des Tropfens meist in einen feinen Faden aus (Abb. 1). Der häufig an einzelnen Stellen verdickte Faden ist auch in der fixierten Zelle (Abb. 2) nach Eisenhämatoxylinfärbung nachweisbar. Gelegentlich ist am Fadenende eine knopfige Verbreiterung zu sehen, die an ein Centrosom (Abb. 3, *Cs*) erinnert.

Die gesetzmäßig korrelierten Bewegungen des Nucleolus' wurden erst erkannt, als mikrokinematographische Zeitrafferaufnahmen eine Beschleunigung der Bewegungsprozesse möglich machten. Die Ergebnisse der Filmanalyse [GIRBARDT (1958)] sollen im folgenden dargestellt werden. Um die Dynamik der Vorgänge einigermaßen veranschaulichen zu können, müssen häufig Serienaufnahmen wiedergegeben werden.

Methodisches

Kultur- und Präparationsbedingungen sind die gleichen, wie bei GIRBARDT (1960a) angegeben.

Zur quantitativen Erfassung der Nucleolusvergrößerung war die Anwendung karyometrischer Methoden notwendig [HENNIG (1957a und b)]. Für vergleichende Untersuchungen [AMBROSIUS (1953), SOST (1955)] kann die Fläche des kugeligen bis ellipsoiden Körpers verwendet werden. Im vorliegenden Falle wird so verfahren, daß entweder in $2^1/_2$ minütigem Abstand je eine photographische Aufnahme des gleichen lebenden Kernes oder mit gleicher Optik viele Aufnahmen fixierter Kerne angefertigt werden. Die Filmnegative werden im photographischen Vergrößerungsapparat 4300fach vergrößert und die Nucleolusumrisse auf Papier gezeichnet. Die so erhaltenen Flächen werden ausplanimetriert oder der Flächeninhalt bestimmt durch Auflegen transparenten Millimeterpapiers und Auszählen der bedeckten Quadrate.

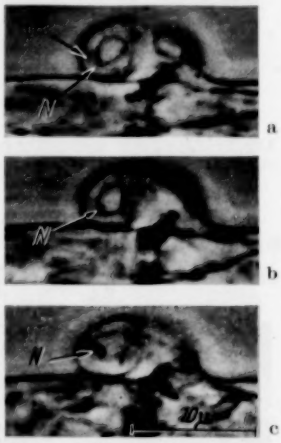


Abb. 4. *Polystictus versicolor:* Entstehung des Nucleolus (N) im Tochterkern nach der Teilung. Dem Kern sitzt außen ein Polbläschen (a: *PB*) auf. Der Nucleolus folgt den Bewegungen dieses Bläschens (b, c). — Phako lebend. Etwa 1665 : 1

Das Nucleolusverhalten bei seiner Neuentstehung nach der Kernteilung

Im jungen Tochterkern von *Polystictus versicolor* entsteht der Nucleolus stets an jener Stelle, die einem Pol der eben abgelaufenen Teilung entspricht. Die ersten morphologischen Anzeichen seiner Bildung sind in Abb. 4a sichtbar. Er steht anfangs in unmittelbarem Kontakt mit der Kernmembran. An seiner Entstehungsstelle liegt, dem Kern von außen eng angeschmiegt, ein „Polbläschen" (Abb. 4a, *PB*). Es ist mit Hämatoxylin anfärbbar (Abb. 5, *Cs*), reagiert jedoch feulgennegativ.

Im Verlauf der nächsten Minute (Abb. 4b, c) nimmt der Nucleolus an Größe zu und bleibt dabei kugelig. Während dieser Zeit findet häufig eine Kerndrehung statt, die am besten an der Verlagerung des „Polbläschens" verfolgt werden kann. (Die Richtung der Pfeile soll etwa die Längsachse des Kernes fortsetzen und damit die Bewegung veranschaulichen.) Der Nucleolus folgt der langsamen Bewegung des

Kernes. Aus Abb. 4c wird ersichtlich, daß er die offensichtlich rasche Bewegung des „Bläschens" (zwischen Abb. 4b und c liegen nur 10 sec)

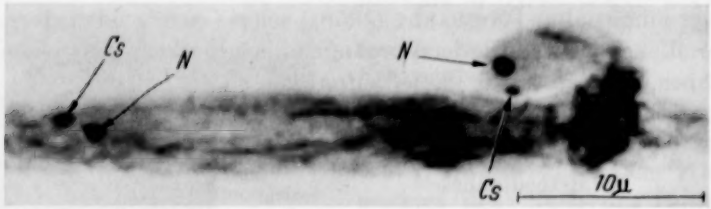


Abb. 5. *Polystictus versicolor:* Färberische Darstellung des centrosomenähnlichen Polbläschens (*Cs*) im jungen Tochterkern. — Fixierung: stark. Flemming. Eisenhämatoxylin. Etwa 2500:1

nicht mehr mitgemacht hat. Er liegt jetzt etwas von der Kernmembran entfernt. Aus der kugeligen ist er in die tropfige Form übergegangen.

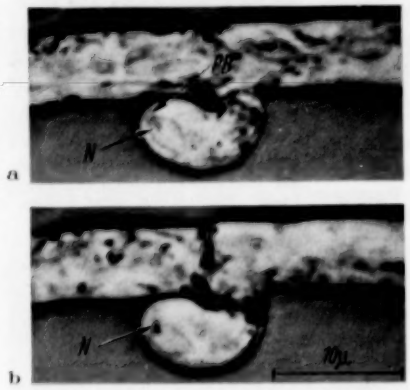


Abb. 6. *Polystictus versicolor:* Nucleolusentstehung im Tochterkern. Den raschen Bewegungen des Polbläschens (*PB*) folgt die Nucleolarsubstanz unter tropfigen Gestaltsänderungen. — Phako lebend. Etwa 1665:1

In Abb. 6a und b liegt der Nucleolus ebenfalls der Kernmembran nicht mehr an. Die schnellen Ortsänderungen des „Polbläschens" (*PB*) haben zur Folge, daß er wiederum in Richtung dieses „Polbläschens" ausgezogen erscheint. Im Laufbild ist diese Relation besonders gut zu erkennen. Sie zeigt sich vor allem dann, wenn der sich vergrößernde Nucleolus ins Kerninnere wandert. Er erscheint dann als großer Tropfen, der an seiner Entstehungsstelle in die Kernmembran mündet.

Selbst wenn starke Streckungen des vergrößerten Nucleolus' auftreten (vgl. Abb. 1 und 2), reißt der Nucleolusfaden nie durch, so daß die Verbindung der Nucleolarsubstanz mit ihrer Entstehungsstelle erhalten bleibt. Im weiteren soll diese Stelle „Nucleolus-Ansatzstelle" (*NA*) genannt werden und jenen Ort bezeichnen, an dem der Nucleolus mit der Kernmembran in einer noch nicht näher bekannten Weise verbunden ist.

Das Nucleolusverhalten beim Kernübertritt aus der Schnalle

Die Fusion des Schnallenauswuchses mit der subterminalen Zelle beginnt, nachdem sich der Fusionshöcker der Schnallenspitze oder einem anderen Teil des Schnallenauswuchses fest angepreßt hat [GIRBARDT

(1956)]. Mit einem Zentralporus beginnend (Abb. 7, *Zp*) schreitet die Wandauflösung in zentrifugaler Richtung fort (Abb. 7a—g). Der nicht aufgelöste ringartige Rest der aneinandergepreßten Membranen (Abb. 7g) bleibt lichtoptisch sichtbar.

Der Zellkern ist meist in drehender Bewegung, solange er im Schnallenauswuchs eingeschlossen ist. Sobald er sich zum Übertritt anschickt, liegt die NA so, daß sie als erster Teil des Kernes den Porus passiert (Abb. 7b). Nachdem die NA die subterminale Zelle erreicht hat, bewegt sie sich dort rasch in rückwärtiger Richtung (Abb. 7c—f). Gelegentlich kommt es nach gerade vollzogenem Übertritt zu einem vorübergehenden Stillstand der Bewegung (Abb. 7g).

Das Verhalten der Nucleolarsubstanz läßt die Korrelation zwischen der NA-Bewegung und der Nucleolusform erkennen. Sobald die NA rasche Bewegungen ausführt (Abb. 7b—f), wirkt eine Zugkraft auf den Nucleolus, der er wahrscheinlich infolge Massenträgheit nicht ohne Änderung seiner Form folgen kann. Das offensichtlich zähflüssige Sol nimmt daher Tropfenform an. Sobald die Zugspannung, wenn auch nur vorübergehend, nachläßt, rundet sich der Nucleolus wieder ab (Abb. 7g).

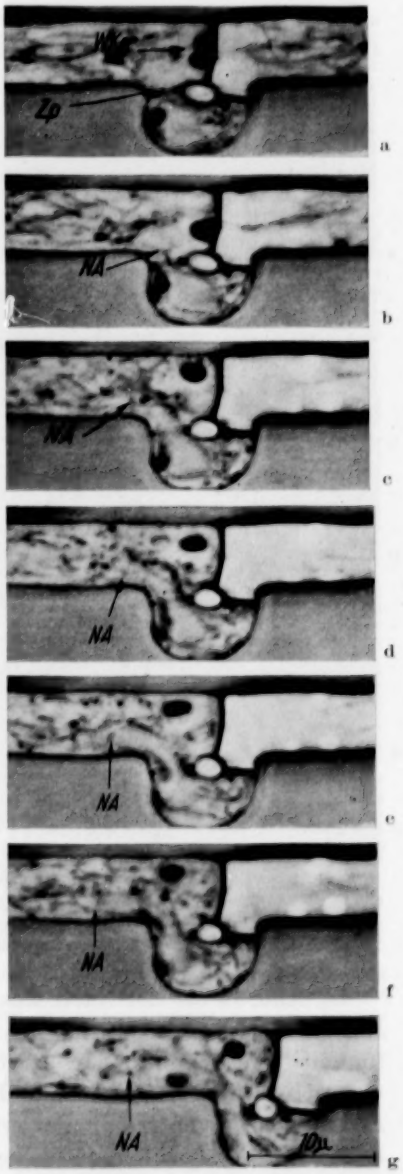


Abb. 7. *Polystictus versicolor:* Verhalten des Nucleolus beim Kernübertritt aus der Schnalle. a: Zentral beginnende Auflösung (*Zp*) der Wände zwischen Schnallenspitze und Hauptphyphe (*WKp* = Wandkörper). b—f: Die Nucleolus-Ansatzstelle (*NA*) wandert rasch in rückwärtiger Richtung, Gesamtkern und Nucleolus folgen dieser Bewegung. g: Sistierung der Bewegung der Nucleolus-Ansatzstelle hat Abkugeln des Nucleolus zur Folge. Phako lebend. Etwa 1665:1

In Abb. 7d—f ist an der NA eine phasenoptisch grau erscheinende Substanz sichtbar, die wahrscheinlich der Kernmembran von außen

aufsitzt. Sie dürfte aus dem „Polbläschen" (Abb. 6, *PB*) hervorgegangen sein, indem dieses an Größe ab- und an Dichte zugenommen hat. Es ist auch in dieser Phase noch eindeutig mit Hämatoxylin anfärbbar. Im weiteren Entwicklungsverlauf verliert es zunehmend an Größe. Es ist etwa dann, wenn die Kerne der Subterminalen wieder nach vorn wandern, lebend nicht mehr und färberisch nur noch gelegentlich zu identifizieren (vgl. Abb. 3).

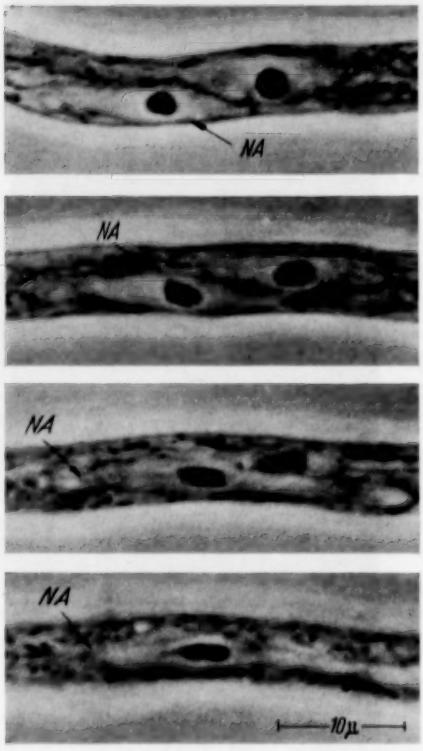


Abb. 8. *Polystictus versicolor:* Drehung der Kerne vor Beginn der Kernteilung. Die Spitze des tropfig ausgezogenen Nucleolus weist jeweils auf die Nucleolus-Ansatzstelle. Phako lebend. Etwa 1665:1

Das Nucleolusverhalten vor dem Einsetzen der Kernteilung

Ehe sich die Kerne zur Teilung anschicken, rücken sie meist nahe zusammen. Ihre Bewegung kommt zum Stillstand. Kurze Zeit später wird, meist unmittelbar hinter den Kernen, der Schnallenauswuchs gebildet. Um diesen zu erreichen, müssen die Kerne eine kurze Strecke rückwärts wandern.

Da bei der normalen Kernwanderung in der Spitzenzelle die NA meist in Richtung der wachsenden Spitze liegt, ist bei Umkehr der Wanderungsrichtung eine Drehung des Kernes oder des Nucleolus' anzunehmen. Eine Vorstellung von den bei einer solchen Drehung ablaufenden morphologischen Veränderungen soll Abb. 8a—d vermitteln.

In Abb. 8a ist der Nucleolus des hinteren Kernes noch schwach in Richtung der wachsenden Spitze ausgezogen. Die Spitze des „Nucleolustropfens" weist auf die durch einen Pfeil markierte Stelle, so daß hier vermutlich die NA liegt. Die Bewegung des vorderen Kernes ist im allgemeinen etwas früher sistiert, auf den Nucleolus haben daher im Augenblick der photographischen Aufnahme keine Kräfte gewirkt: Er ist abgerundet.

Eine Minute später (Abb. 8b) ist die Drehung beim vorderen Kern bereits abgeschlossen, der Nucleolus erscheint tropfenförmig nach rück-

wärts ausgezogen. Im anderen Kern (Abb. 8b) ist die Drehung noch im Gange, und nach weiteren 30 sec vollendet (Abb. 8c). Die Nucleolen werden nun stark ausgezogen (Abb. 8c und d), da die NA beider Kerne sich rasch nach rückwärts bewegen. Sie gelangen damit in den Bereich des Schnallenauswuchses (Abb. 9, *SA*). Das tropfig-fädige Ausziehen der Nucleolarsubstanz (Abb. 9, *NF*) ist deutlich zu sehen.

Abb. 9. *Polystictus versicolor:* Zellkerne in der Schnallenregion. Die Nucleolus-Ansatzstelle beider Kerne liegen hinter dem Hals des noch nicht fertiggestellten Schnallenauswuchses (*SA*). Das fädige Ausziehen (*NF*) wird besonders deutlich, da in dieser Phase die Nucleolus-Ansatzstelle sehr intensive Bewegungen durchführt. — Phako lebend. Etwa 1665:1

Die eigentlichen Kernteilungsprozesse beginnen erst, wenn einer der beiden Kerne in die Schnalle gelangt ist. Das Zeitrafferbild hat offenbart, *daß nur die NA einwandern kann*. Wenn daher die Kerne so liegen, wie es Abb. 9 zeigt, dann bewegen sich die NA so lange vor- und rückwärts, bis einer der beiden die zum Einwandern notwendige Ausgangsposition, d. h. den Hals des Schnallenauswuchses erreicht hat. Es kommt vor, daß die NA beider Kerne im Zuge ihrer Rückwärtsbewegung noch weiter nach hinten verlagert werden, als es Abb. 9 zeigt. Das „Einpendeln" der NA ist dann besonders gut zu verfolgen.

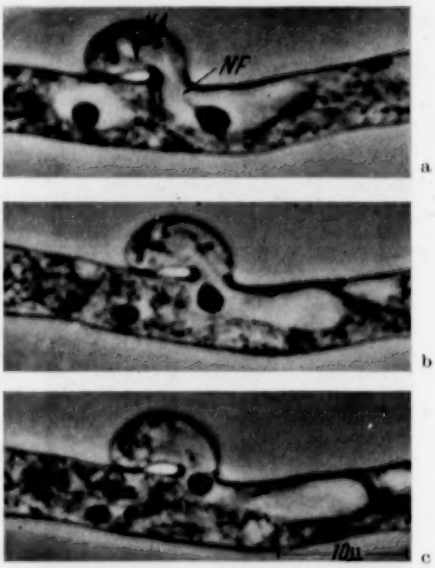


Abb. 10. *Polystictus versicolor:* Einwandern der Nucleolus-Ansatzstelle des einen Kerns in den Schnallenauswuchs. a, b: Der Nucleolus ist noch mit der Nucleolus-Ansatzstelle verbunden, reißt dann aber plötzlich ab, wobei er sich abkugelt (c). — Phako lebend. Etwa 1665:1

Es scheint nicht gleichgültig zu sein, welcher der beiden Kerne in den Schnallenauswuchs einwandert. Aus Positionen, wie in Abb. 9, kann die NA des dem Schnallenauswuchs zunächst abgewandten (hier untenliegenden) Kernes in den Schnallenauswuchs eintreten. Dabei wird der hinderliche andere Kern förmlich beiseite geschoben, bis der Schnallenhals frei ist. Die Vermutung liegt nahe, daß der aus der Schnalle stammende Tochterkern bei der nächsten Teilung wieder in die Schnalle gelangen muß. Filmisch registrierte Beobachtungen zeigen, daß der Schnallenkern nach seinem Übertritt

in die Subterminale und dem Einwandern in die neugebildete Nebenhyphe in die dort entstehende Schnalle gelangt. Eine endgültige Bestätigung, ob hier Gesetzmäßigkeiten vorliegen, steht noch aus. Die kontinuierliche Beobachtung eines Kernes gestaltet sich in der entscheidenden Phase der Schnallenbildung äußerst schwierig, vor allem dann, wenn die Hyphen in den Nährboden eingewachsen sind, wie es fast ausnahmslos nach Deckglasauflage der Fall ist.

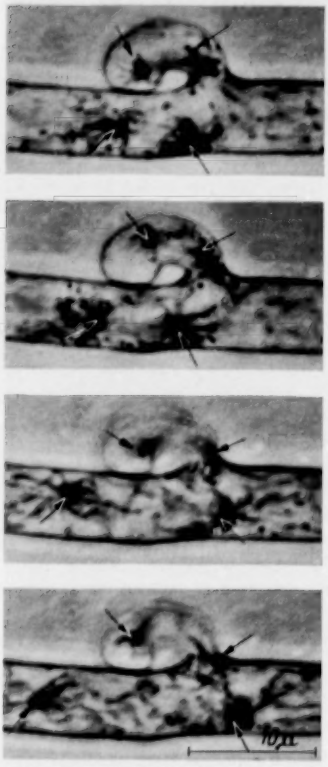


Abb. 11. *Polystictus versicolor:* Koppelung der Bewegung von Chondriosomen und Tochterkernen in der Endphase der Kernteilung. Die Pfeile weisen auf die auseinanderweichenden Tochterkerne. Phako lebend. Etwa 1665:1.

Hat die NA den Schnallenhals erreicht, so läuft ihr weiteres Einwandern in den Schnallenauswuchs meist rasch ab (Abb. 10a). Der Nucleolus ist nach wie vor mit ihr verbunden (*NF* in Abb. 10). Die NA wird nun zum Zentrum der Kernteilungsprozesse, wie ausführlich an anderem Ort darzulegen sein wird. Vorher reißt jedoch die Verbindung zwischen Nucleolus und NA plötzlich durch (Abb. 10c). Der Nucleolus kugelt sich augenblicklich ab und wird kurze Zeit danach innerhalb des Außenkernraumes aufgelöst.

Koppelung zwischen Kern- und Chondriosomenbewegung

Der voll entwickelte Interphasekern in subterminaler und Spitzenzelle scheint unabhängig von den Bewegungen der ihn umgebenden fädigen Chondriosomen zu sein. Es können keine Anzeichen dafür gefunden werden, daß ein dauernder Kontakt zwischen ihm oder einer bestimmten Stelle seiner Membran und den Chondriosomen besteht. Die Chondriosomen vermögen zwar vorübergehend an der Kernmembran zu haften, sie lösen sich aber stets nach kurzer Zeit wieder ab.

Völlig anders sieht das Bild in der Endphase der Kernteilung und der anschließenden Rekonstruktionsphase der Tochterkerne aus, während jenes Zeitabschnitts also, in dem das „Polbläschen" bzw. die graue Polsubstanz morphologisch nachweisbar ist. Die Pole der Kernteilungsfigur sind Anziehungspunkte sowohl für fädige wie granuläre Zelleinschlüsse (Abb. 11a). Besonders die fädigen Chondriosomen bleiben

mit den auseinanderweichenden Tochterkernen verbunden (Abb. 11 b bis d). Die Haftstellen sind die ehemaligen Pole der Teilungsfiguren.

Während der Nucleolusneubildung wird am Haupthyphenkern (Abb. 12 a bis i) deutlich, daß die Chondriosomen in der Region der NA mit dem Kern verbunden sind. Gelegentlich (Abb. 12 c, d und g) ist zu erkennen, daß sie nicht direkt der Kernmembran aufsitzen, sondern ihr Haftzentrum etwas vom Kern entfernt liegt. Es dürften daher kaum Zweifel bestehen, daß dieses Haftzentrum identisch ist mit dem Polbläschen.

Eine Drehung der NA (Abb. 12 d bis g) demonstriert, daß Nucleolus und Chondriosomen der Bewegung folgen. Abb. 12 h und i zeigen, daß der Nucleolus bei dieser Drehung um über 90° verlagert ist. (Die ansetzenden Chondriosomen sind infolge anderer Einstellebene nicht mehr sichtbar.) So lange der Kern noch rasch wandert (Abb. 12 a und b), erscheinen die Chondriosomen wie gestraffte Fäden. Sie sind entspannt (Abb. 12 d und g), wenn die NA sich nur drehend bewegt.

Quantitative Bestimmung der Nucleolus-Größenzunahme in der Interphase

Es muß die Möglichkeit erwogen werden, ob die Verbindung des Nucleolus' mit der Kernmembran

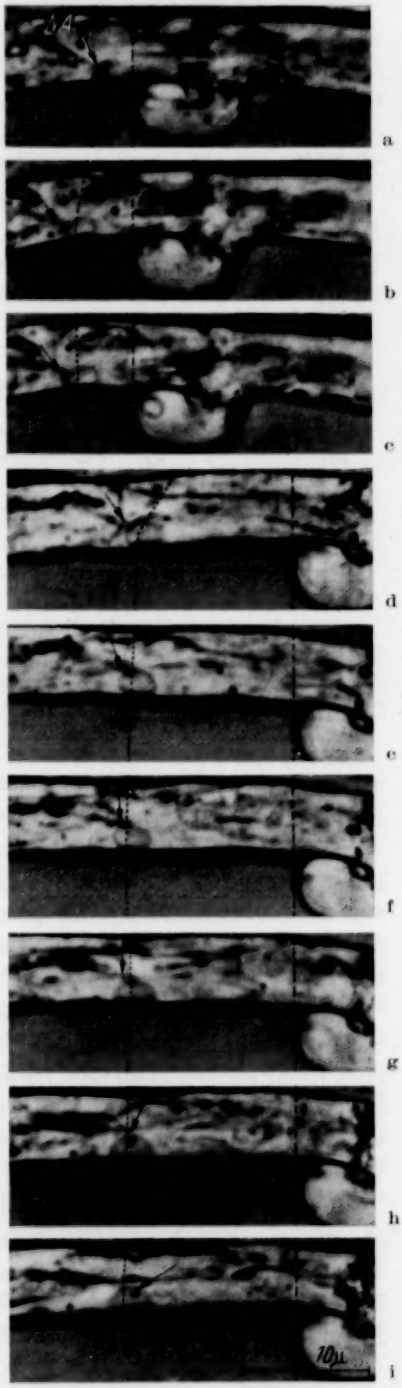


Abb. 12. *Polystictus versicolor:* Am jungen Tochterkern haften die Chondriosomen an der Nucleolus-Ansatzstelle bzw. dem Polbläschen (durch Pfeil markiert). Sie folgen Bewegungen der Nucleolus-Ansatzstelle (c—g) unter Änderung ihrer Form. – Phako lebend. Etwa 1665:1

auch dazu benutzt wird, Nucleolarsubstanz auszuschleusen. Wenn es sich dabei um schubweise Extrusionen handeln sollte, so ist zu erwarten, daß sich dies in der Nucleolusgröße manifestiert. Die günstigen Objekteigenschaften bieten die Möglichkeit, an *einem* lebenden Kern die Größenvariation des Nucleolus zwischen 2 Teilungen registrieren zu können.

Die Ergebnisse der Flächenmessungen an medianen optischen Schnitten von Nucleolen sind in Abb. 13 und 14 dargestellt. Die beiden Kurven der Abb. 13 repräsentieren den Verlauf der Größenzunahme zweier Nucleolen aus verschiedenen Hyphen. Als Zeitwert 0 ist die

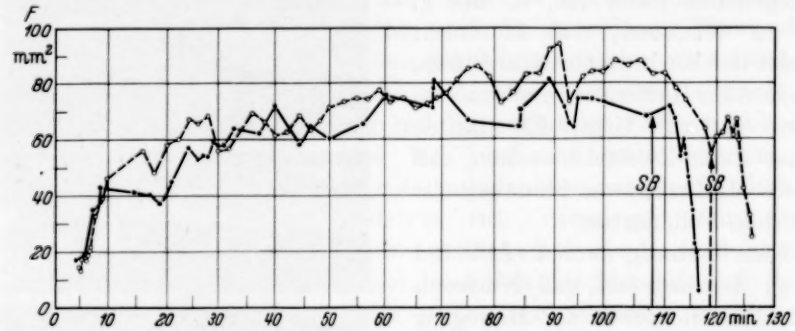


Abb. 13. Größenzunahme der Nucleolen in der Interphase. Messungen an der lebenden Zelle. Abszisse: Zeit nach beendeter Teilung. Ordinate: Flächeninhalt des Nucleolus im medianen optischen Schnitt (4300fache optische Vergrößerung). Wiedergegeben sind die Werte für 2 Kerne verschiedener Hyphen. *SB* = Beginn des Schnallenauswuchses

abgeschlossene Kernteilung gewählt. Die nächste Kernteilung beginnt (Abb. 13, *SB*) in einem Falle nach 108 min, im anderen nach 118 min.

Beide Kurven zeigen prinzipiell den gleichen Verlauf. Nach anfänglicher rascher Größenzunahme des Nucleolus' strebt die Nucleolusgröße einem Maximalwert zu, der etwa 10—20 min vor der Teilung erreicht ist. Die rasche Auflösung der Nucleolarsubstanz mit einsetzender Kernteilung ist aus dem steilen Abfall des Endteils beider Kurven ersichtlich.

Bemerkenswert ist, daß die Größenabnahme schon 4 min nach Schnallenbeginn einsetzt, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Schnalle noch nicht fertiggestellt ist. Da morphologische Änderungen am Chromatin erst beginnen, wenn die NA in den fertigen Schnallenauswuchs einwandert, bedeutet dies, daß die Substanzauflösung des Nucleolus bereits vorher einsetzt.

Leider kann die Frage vorläufig nicht eindeutig beantwortet werden, ob die periodisch wiederkehrenden Verminderungen des Nucleolus-Flächeninhaltes Extrusionen anzeigt. Die Formenvarianz des Nucleolus gestattet keinen zweifelsfreien Vergleich der gemessenen Werte, wie sie ja auch eine Volumenbestimmung durch Berechnung unmöglich macht. Nach dem Kurvenverlauf sind Substanzausschleusungen durchaus

möglich. Falls sie vorhanden sind, vermögen sie jedoch nicht die praktisch während der gesamten Interphase anhaltende Tendenz zur Nucleolusvergrößerung aufzuhalten.

Es ist wahrscheinlich, daß die Größenzunahme des Nucleolus eine zumindest teilweise echte Substanzvermehrung anzeigt. Reine Quellungsvorgänge müßten sich in einer Änderung der Brechzahl zeigen. Solche Änderungen etwa in Form von Nucleolus-Vacuolenbildung fallen lichtoptisch sofort auf. Vacuolisierte Nucleolen sind nicht in die Messungen aufgenommen worden. Offen bleiben muß die Frage, ob die

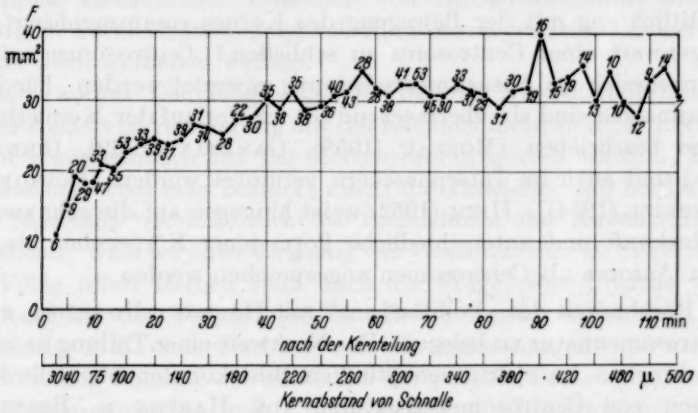


Abb. 14. Größenzunahme der Nucleolen in der Interphase. Messungen an fixierten Zellen. Die Kurvenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus der jeweils angegebenen Zahl gemessener Nucleolen. Übrige Angaben s. Abb. 1

substrukturellen „Nucleolus-Einheiten" [GIRBARDT (1958a)] oder die dazwischenliegende Substanz vermehrt ist.

Um zu prüfen, ob die Nucleolusvergrößerung auch im fixierten Objekt zu konstatieren ist, werden gleichartige Messungen an nach FLEMMING fixierten und nach HEIDENHAIN gefärbten Präparaten durchgeführt (Abb. 14). Der Kernabstand von der Schnalle ist ein Maß für die seit der Kernteilung verflossene Zeit. In den ersten 5 min besitzen die Kerne Durchschnittsgeschwindigkeiten von 8 μ/min. Diese Geschwindigkeit sinkt im Verlaufe der ersten 15 min allmählich auf den Normalwert (4 μ/min) ab. Ein Kern, der im fixierten Bild 40 μ von der Schnalle entfernt liegt, ist daher etwa 5 min alt. Auf diese Weise ist es möglich, die vom lebenden Nucleolus *einer* Zelle erhaltenen Werte mit den Nucleolen *vieler* toter Zellen zu vergleichen.

Durch die Fixierung schrumpfen die Nucleolen, bezogen auf ihre Flächen, durchschnittlich um den Faktor 2, 3. Die Werte der Ordinate von Abb. 14 sind daher gegenüber denen der Abb. 13 um das 2,3fache überhöht.

Der Kurvenverlauf in Abb. 14 ist in guter Übereinstimmung mit dem der Abb. 13. Die kontinuierliche Größenzunahme des Nucleolus' während eines Großteils der Interphase dürfte danach als real angesehen werden. Anzeichen einschneidender Nucleolus-Extrusionen oder einer besonderen Rhythmik des Nucleoluswachstums [JERUSALEM (1957)] können nicht gefunden werden.

Besprechung der Ergebnisse

Besteht Berechtigung, aus dem Vorliegen eines Aktivitätspoles, der offensichtlich eng mit der Bewegung des Kernes zusammenhängt, auf die Gegenwart eines Centrosoms zu schließen? Centrosomen müssen im Pflanzenreich als Ausnahmeerscheinung gewertet werden. Für Pilze und Braunalgen sind sie überraschend oft im Verlauf der Kernteilungsvorgänge beschrieben [MOREAU (1958), GANESAN (1959), GIRBARDT (1960b)] und auch im Interphasekern vermutet worden [DOWDING u. BAKERSPIGEL (1954)]. HEIM (1952) weist hingegen auf die sehr zweifelhafte Herkunft und unterschiedliche Form jener Körperchen hin, die von den Autoren als Centrosomen angesprochen werden.

Die Färbbarkeit des „Polbläschens" mit Hämatoxylin genügt nicht, die Centrosomennatur zu belegen. Der Nachweis einer Teilung ist bisher nicht gelungen. Im elektronenoptischen Bild konnten ebenfalls keine Anzeichen von Centrosomenstrukturen [DE HARVEN u. BERNHARD (1956, 1958)] nachgewiesen werden. Es erscheint daher geboten, vorläufig den Terminus Centrosom für den Bewegungsaktivitätspol des Kernes von *Polystictus versicolor* zu vermeiden.

Das *Vorhandensein* eines Aktivitätspols darf jedoch nach den dargestellten Befunden kaum noch bezweifelt werden. Die Auswirkung der an diesen Pol ansetzenden Kräfte ist am Formenwechsel des Nucleolus demonstriert worden. Besonders stark sind die Kräfte vor dem Einsetzen der Kernteilung und in der Phase unmittelbar nach abgeschlossener Teilung. In diesen Zeitabschnitten muß daher mit einer besonderen Aktivierung der die Bewegungsenergie liefernden Prozesse gerechnet werden.

Bislang kann nichts ausgesagt werden über Art und Herkunft dieser Kräfte. Die energieliefernden Substanzen können sowohl intra- wie extranucleärer Herkunft sein. Die Vermutung, daß in der Nucleolarsubstanz das Energiereservoir gesucht werden muß, liegt nahe. Eine Beteiligung der Chondriosomen ist angezeigt. Ob mit der Vorstellung polarer Ausscheidung von organischen Säuren [GÄUMANN (1941)] auszukommen ist, muß fraglich erscheinen, da hierbei der Aktivitätspol stets „hinten", d. h. der Bewegungsrichtung abgewandt, liegen müßte, was meist nicht der Fall ist.

Der hohe Q_{10}-Wert von 6,0 für die Kernbewegung bei *Schizophyllum commune* [SNIDER u. RAPER (1958)] deutet an, daß chemische Prozesse eng mit der Kernwanderung gekoppelt sein müssen. Ähnliche Deutung erheischen die Befunde, daß über längere Zeit bei *Polystictus versicolor* unter anomalen Verhältnissen [GIRBARDT (1956)] die Wanderungsgeschwindigkeiten der Kerne den 10fachen Wert der Normalgeschwindigkeit erreichen können.

Es ist vorläufig nicht zu entscheiden, welcher Art die Verbindung des Nucleolus mit der Kernmembran ist. Bei Annahme einer Verknüpfung struktureller Einheiten von Nucleolarsubstanz und Kernmembran wären elektronenoptisch Hinweise zu erwarten. Diese konnten bisher nicht gefunden werden.

Eine andere Denkmöglichkeit ist, daß die Nucleolarsubstanz nur in fester adhäsiver Verbindung mit der Kernmembran steht. Die NA müßte dann gewissermaßen auf der Kernmembran gleiten können. In dieser Vorstellung wird man bestärkt durch die Tatsache, daß bei Drehungen des Nucleolus' (Abb. 8) sich die Spindelform des Außenkernes nicht verändert, was bei einer Drehung des Gesamtkernes zu erwarten wäre.

Völlig offen bleiben muß auch die Frage, was Ursache und was Wirkung bei den Bewegungen ist. Es ist ebensogut denkbar, daß die Auslösung z. B. einer Drehung vom Nucleolus ausgeht und an der NA zur Wirkung kommt, wie auch, daß der primäre Prozeß sich an der NA im Zusammenwirken mit Cytoplasma und Chondriosomen abspielt. Erst nach Klärung dieser Teilfragen wird es möglich sein, zu der Frage Stellung zu nehmen, ob dem Kern „aktive Beweglichkeit" zukommt [vgl. GIRBARDT (1960b)] oder ob er nur passiv vom Cytoplasma mitgeschleppt wird. Beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen sprechen die Befunde dafür, daß der Zellkern von *Polystictus versicolor* aktiv an den ihn bewegenden Prozessen beteiligt ist.

Zusammenfassung

Der Zellkern von *Polystictus versicolor* ist polar gebaut. Die bereits während der Kernteilung induzierte Polarität bleibt während der gesamten Interphase erhalten.

Mit dem als Aktivitätszentrum des Zellkernes fungierenden Pol ist der Nucleolus dauernd verbunden. Sein Formenwandel ist daher die morphologische Manifestation der Reaktion eines zähflüssigen Körpers auf die am Aktivitätszentrum angreifenden Kräfte. Die Entstehungsstelle des Nucleolus im jungen Tochterkern ist isolokal mit seinem Anheftungspunkt an der Kernmembran (= NA). Von außen sitzt dem Kern in der Entstehungsphase des Nucleolus' ein „Polbläschen" auf, das mit Hämatoxylin färbbar ist. Es wird diskutiert, ob es sich dabei um ein Centrosom handelt.

Am „Polbläschen" haften in jungen Tochterzellen zahlreiche Chondriosomen, die alle Bewegungen des Aktivitätszentrums mitmachen. Die Verbindung der Chondriosomen mit dem voll entwickelten Kern ist nicht mehr nachweisbar.

Der Nucleolus zeigt während der gesamten Interphase eine zunächst rasche, dann langsamere Größenzunahme. Er hat seine Maximalgröße etwa 10—20 min vor der nächsten Kernteilung erreicht. Größenabnahmen, die auf periodische Extrusionen größerer Substanzmengen schließen lassen, können nicht gefunden werden.

Das Bewegungsverhalten des Kernes deutet darauf hin, daß der Kern aktiv an den ihn bewegenden Prozessen beteiligt ist.

Literatur

ALLEN, R.: A cytological study of *Erysiphe polygoni* on *Delphinium*. J. agricult. Res. **53**, 801—818 (1936).

ALTMANN, H. W.: Über die Abgabe von Kernstoffen in das Protoplasma der menschlichen Leberzelle. Z. Naturforsch. 4b, 138—144 (1949).

ALTMANN, H. W.: Über den Funktionsformwechsel des Kernes im exokrinen Gewebe des Pankreas. Z. Krebsforsch. **58**, 632—645 (1952).

AMBROSIUS, H.: Über die Genauigkeit und zeitliche Rentabilität von Zellkern-Meßmethoden. Mikroskopie **8**, 95—102 (1953).

BENSAUDE, M.: Recherches sur le cycle évolutif et la sexualité chez les Basidiomycètes. These, Namur 1918, 156 S.

BERG, W.: Über den Übertritt von Kernstoffen in das Zytoplasma. Z. mikr.-anat. Forsch. **28**, 565 (1932).

BRACHET, J.: Biochemical Cytology. New York: Academic Press Inc., Publishers 1957.

DOWDING, E. S., and A. BAKERSPIGEL: The migrating nucleus. Canad. J. Microbiol. **1**, 68—78 (1954).

EHRET, C. F., and E. L. POWERS: Macronuclear and nucleolar development in *Paramecium bursaria*. Exp. Cell Res. **9**, 241—257 (1955).

EVANS, J. B.: The cereal rusts. I. The development of their uredo mycelia. Ann. Bot. **21**, 441—466 (1907).

FREDERIC, J., et M. CHÉVREMONT: Recherches sur les chondriosomes de cellules vivantes par la microscopie et la microcinématographie en contrast de phase (1. partie). Arch. Biol. (Liège) **63**, 109—131 (1952).

GÄUMANN, E.: Über die Geschwindigkeit der Kernwanderung bei Pilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **59**, 283—287 (1941).

GANESAN, A. T.: The cytology of Saccharomyces. C. R. Lab. Carlsberg **31**, 149—174 (1959).

GEITLER, L.: Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen.) Arch. Protistenk. **78**, 1—226 (1932).

GIRBARDT, M.: Schnallenanomalien bei *Polystictus versicolor* (L.). Arch. Mikrobiol. **23**, 413—422 (1956).

GIRBARDT, M.: Der Zellkern von *Polystictus versicolor*. Film THF 202 (1958).

GIRBARDT, M.: Über die Substruktur von *Polystictus versicolor* (L). Arch. Mikrobiol. **28**, 255—269 (1958a).

GIRBARDT, M.: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen an *Polystictus versicolor* (L). I. Der Wassergehalt des Cytoplasmas vegetativer Zellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **73**, 227—240 (1960a).

GIRBARDT, M.: Kernbewegungen. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XVII, 2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960b (im Druck).

GUILLIERMOND, A.: Remarques sur la karyokinèse des Ascomycètes. Ann. mycol. **3**, 344—361 (1905).

HÄMMERLING, J.: Entwicklung und Formbildungsvermögen von *Acetabularia mediterranea*. Vorl. Mitt. Biol. Zbl. **51**, 633—647 (1931).

HARVEN, E. DE, and W. BERNHARD: Z. Zellforsch. **45**, 378 (1956).

HARVEN, E. DE, et W. BERNHARD: Ultrastructure du centriole. IV. Intern. Congr. f. Elektronenmikroskopie, Berlin 1958.

HEIM, P.: Observations sur le noyau des basidiomycetes. Rev. Mycol. **19**, 201—249 (1954).

HEIM, P. G.: Observation sur le noyau des ascomycetes. Rev. Mycol. **17**, 3—38 (1952).

HENNIG, A.: Fehler der Oberflächenbestimmung von Kernen bei endlicher Schnittdicke. Mikroskopie **12**, 7—11 (1957a).

HENNIG, A.: Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. Mikroskopie **12**, 174—202 (1957b).

HORSTMANN, E., u. A. KNOOP: Zur Struktur des Nucleolus und des Kerns. Z. Zellforsch. **46**, 100—107 (1957).

JERUSALEM, CH.: Wachstum und funktionelle Größenänderungen der Nucleolen. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **149**, 504—527 (1957).

KUSANO, S.: Cytology of *Synchytrium fulgens* Schroet. J. Coll. Agricult. Imp. Univ. Tokyo **10**, 347—388 (1930).

LAGERHEIM, G.: Untersuchungen über die Monoblepharideen. Kgl. Sv. Vet.-Akad. Handl. **25**, Nr 8 (1900).

LENOIR, M.: Le noyau et le cytoplasme vivant dans l'eperon de graines jeunes du *Corydalis cava*. C. R. Soc. Biol. (Paris) **110**, 615 (1932).

LETTRÉ, R., u. W. SIEBS: Beobachtungen am Nucleolus in vitro gezüchteter Zellen. Z. Krebsforsch. **60**, 19—30 (1954a).

LETTRÉ, R., u. W. SIEBS: Zur Struktur des Nucleolus. Naturwissenschaften **41**, 458 (1954b).

LINDEGREN, C. C.: The mechanics of budding and copulation in *Saccharomyces*. Exp. Cell Res. **2**, 303—311 (1951).

LINDEGREN, C. C., and G. F. TOWNSEND: Methods of distinguishing the spindle, the centrochromatin and the chromosomes of the yeast cell. Cytologia **19**, 104—109 (1954).

LINSBAUER, K.: Kerne, Nukleolen und Plasmabewegungen in den Blasenzellen von *Mesembryanthemum cristallinum*. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I **141**, 1—30 (1952).

LUDFORD, R. J.: Nuclear activity in tissue cultures. Proc. roy. Soc. B **98**, 457, 467 (1925).

MAIRE, R.: Recherches cytologiques et taxonomiques sur les Basidiomycètes. Thèse Paris 1902. 209 S.

MAIRE, R.: La mitose hétérotypique et la signification des protochromosomes chez les Basiciomycètes. C. R. Soc. Biol. (Paris) **58**, 726—728 (1905).

MATTHEWS, A. C.: Cytological observations on zoospore formation in *Leptolegnia caudata* de Bary. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. **47**, 281—292 (1932).

MOREAU, F.: Les progrès récents de la cytologie de Champignons en microscopie usuelle et en microscopie corpusculaire. Bull. Soc. bot. France **105**, 363—429 (1958).

MÜLLER, K. O.: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Hypochnus solani* P. u. D. (*Rhizoctonia solani* K.). Arb. biol. Reichsanst. **13**, 197—262 (1924).

Němec, B.: *Jaraia salicis*. Studies Plant physiol. Labor. Charles Univ. Prague **4**, Nr 1, 21 S. (1931).

Nishimura, M.: Studies in *Plasmopara Halstedii* II. J. Coll. Agricult. Hokkaido, Imp. Univ. Sapporo **17**, 1—61 (1926).

Ruhland, W.: Zur Kenntnis der intrazellularen Karyogamie bei den Basidiomyceten. Bot. Ztg **59**, 187—206 (1901).

Saguchi, J.: Cytologische Studien. I. Untersuchungen über die Wechselbeziehung zwischen Karyo- und Zytoplasma. Tokyo: Maruzen 1927. 79 S.

Schmid, R.: Über die Struktur und Teilung der Kerne von *Geotrichum candidum* und *Geotrichum magnusii*. Planta (Berl.) **52**, 320—333 (1958).

Schussnig, B.: Handbuch der Protophytenkunde. Jena: Gustav Fischer 1953.

Snider, P. J., and I. R. Raper: Nuclear migration in the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. Amer. J. Bot. **45**, 538—546 (1958).

Sost, H.: Über die Determination des Generationswechsels von *Allomyces arbuscula* (Butl.) (Polyploidieversuche). Arch. Protistenk. **100**, 541—564 (1955).

Vincent, W. S.: Structure and chemistry of nucleoli. Int. Rev. Cytol. **4**, 269—298 (1955).

Webb, R.: The cytology and life history of *Sorosphaera veronicae*. Ann. Bot. **49**, 41—52 (1935).

Woll, E.: Zur Abgabe von Nucleolusstoffen an das Cytoplasma. Planta (Berl.) **47**, 299—302 (1956).

Dr. Manfred Girbardt,
Jena, Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Beuthenbergstr. 11

Planta 55, 381—389 (1960)

Aus dem Biologischen Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha

ZUR FRAGE DER p_H-BESTIMMUNG BEI COLORIMETRISCHEN ASSIMILATIONSMESSUNGEN

Von

JIŘÍ ČATSKÝ

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juli 1960)

Einleitung

Eine zuverlässige p_H-Bestimmung der Bicarbonatlösung ist der begrenzende Faktor der Genauigkeit der Ermittlung der CO_2-Konzentration in der Luft mittels der Methode nach KAUKO (z. B. KAUKO 1934, 1935). Bei einer colorimetrischen Modifikation dieser Methode ist bisher als farbiger p_H-Indicator Kresolrot verwendet worden. Der Farbenumschlag dieses Indicators endet jedoch bei p_H 8,2, also bei einem Werte, welcher der normalen CO_2-Konzentration in der Luft entspricht. Praktisch sind jedoch die Farbunterschiede schon von p_H 8,05—8,10 wenig sichtbar und setzen darum die Genauigkeit der Bestimmung herab.

Wie aus der Arbeit FRENZELS (1955) hervorgeht, ist die ursprüngliche Verwendung der Methode nach KAUKO durch ÅLVIK (1939) zur Bestimmung der Assimilation und Atmung der Pflanzen mit einer Reihe von Fehlern behaftet (langsame Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Luft und Bicarbonatlösung, Absinken der CO_2-Konzentration in abgeschlossener Kammer im Laufe des Versuches, Überhitzung des Blattes bei starker Einstrahlung u. a.). Das einfache Kaukosche Prinzip kann jedoch zur Analyse der Luft bei einer Durchströmungsbestimmung der Assimilationsintensität verwendet werden (ČATSKÝ u. SLAVÍK 1958). Diese Möglichkeit führte uns zur Konstruktion eines Terrain-Apparates, der eine einfache kontinuierliche Analyse von vier (ČATSKÝ u. SLAVÍK 1960) oder von sechs Luftströmungen (Abb. 1 und 2) ermöglicht.

Bei Anwendung der Methode im Luftstrom messen wir die CO_2-Konzentration in der Kontrolluft und in der durch die Pflanze verarmten Luft, also die p_H-Werte nach der Temperatur zwischen 8,1 und 8,4. Zur genauen Bestimmung des p_H in diesem Bereich kann man nicht mehr Kresolrot verwenden; darum schlugen wir die Verwendung eines Gemisches von Thymolblau und Kresolrot vor, das uns eine genügend genaue Abschätzung des p_H-Wertes in der Spanne von 7,6—8,6 mit einer Höchstempfindlichkeit zwischen 8,0 und 8,3 ermöglicht. In der letzten Zeit bezweifelt LIETH (1960) die Gültigkeit von LANGES Formel (1956) bei der Verwendung anderer Indicatoren (oder anderer Konzentrationen) als des bei der Verwendung des von LANGE in einer Konzentration von 10 mg je Liter vorgeschlagenen Kresolrotes. Aufgabe der vorliegenden Arbeit

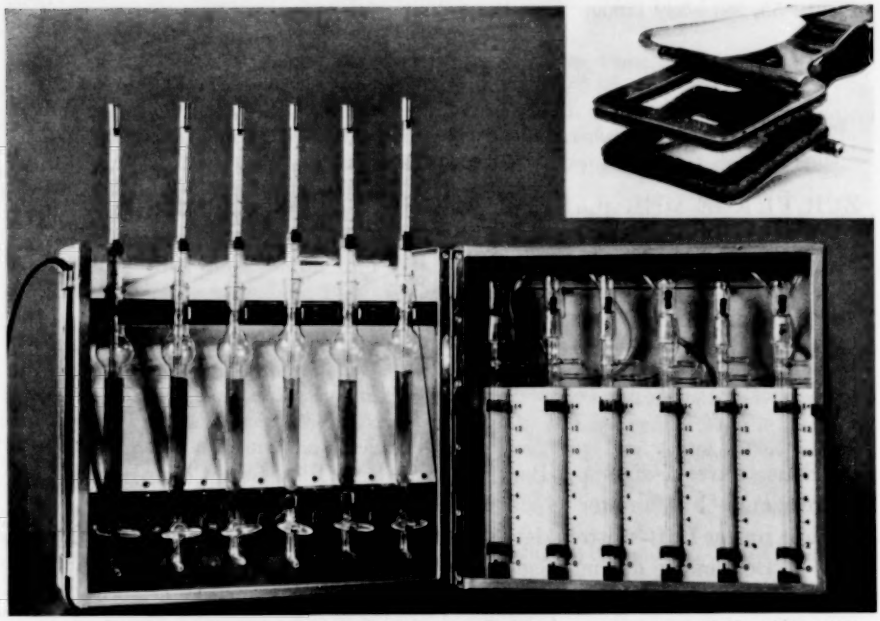


Abb. 1. Freiland-Apparat zur colorimetrischen Bestimmung der Assimilationsintensität mittels der Durchströmungsmethode, vorbereitet zur Verwendung. Die Mittelwand mit den Capillar-Strömungsmessern ist aufgedeckt (rechts). Rechts oben ist eine zangenförmige Assimilationskammer zu sehen

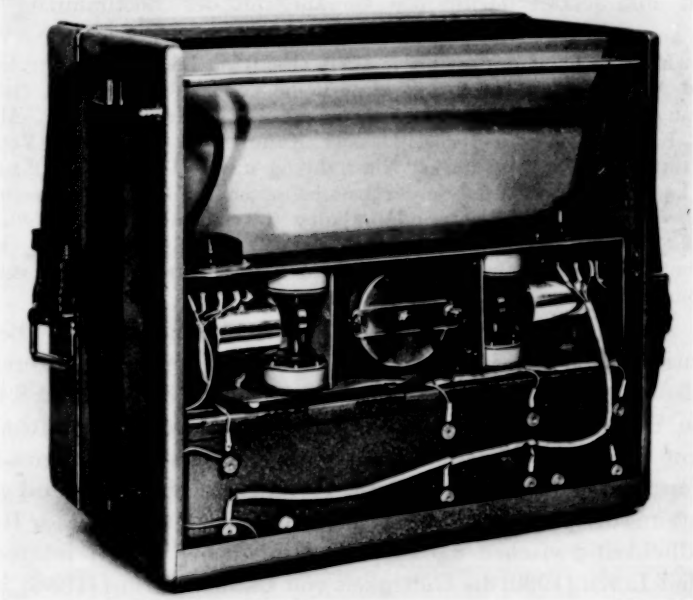


Abb. 2. Hinterseite des Apparates mit einem leicht herausnehmbaren Satz von 4 Membranpumpen, betrieben mittels zweier kleiner 12 V-Elektromotoren. Im Futteral unter den Pumpen befinden sich je 20 Taschenlampenbatterien zu je 4,5 V, die für 30—50 Std Betriebszeit des Apparates ausreichen. Gewicht des Apparates: etwa 9 kg, Ausmaße: 330 × 300 × 190 mm

war es also festzustellen, wieweit LANGEs Formel auch bei einer p_H-Bestimmung mittels des von uns vorgeschlagenen Indicatorengemisches verwendbar ist, und auf einige Fragen hinzuweisen, die mit der p_H-Bestimmung bei Anwendung der Durchströmungsmethode zusammenhängen. Eine besondere Bedeutung wird der Durchprüfung der Glaubwürdigkeit der praktischen Ergebnisse des von uns verwendeten Verfahrens zugemessen unter der Voraussetzung, daß die Zuverlässigkeit des Prinzipes der Kaukoschen Methode bereits genügend erwiesen erscheint (LANGE 1956, LIETH 1958).

Methodik

Die Grundlösungen der farbigen Indicatoren des p_H wurden aus Substanzen der Firma Lachema (Brno) hergestellt, die in 90% Äthanol aufgelöst worden waren: 0,05% Thymolblaulösung und 0,05% Kresolrotlösung. Die Bicarbonatlösung wurde aus Substanzen *pro analysi* derselben Firma zubereitet: 0,084 g $NaHCO_3$ + 7,46 g KCl + eine bestimmte Menge der einen oder beider Indicatoren-Grundlösungen wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

Für die Herstellung der Stufensätze der Pufferlösungen verwendeten wir Boratpuffer (ZELLER 1951). Beiden Stammlösungen wurde der p_H-Indicator in einer Konzentration zugegeben, die für die einzelnen Versuche bestimmt war. So wurde eine gleiche Konzentration der Farbstoffe in allen Pufferlösungen erzielt. Die Lösungen wurden in Ampullen eingeschmolzen und durch die Zugabe eines Körnchens Thymol konserviert.

Zu den Versuchen wurden folgende Apparate verwendet: p_H-Meter PHM 3ik mit hochohmiger Glaselektrode, Radiometer (Kopenhagen); Ultrarotabsorptionsschreiber Infralyt, Junkalor (Dessau); Photocolorimeter nach Dr. B. LANGE, Modell IV.

Ergebnisse

1a. Einfluß der Zugabe von Farbindicator auf den p_H-Wert der Bicarbonatlösung. Mittels eines Kompensations-p_H-Meters mit Glaselektrode wurden die p_H-Werte der reinen Bicarbonatlösung (0,001 n $NaHCO_3$ + 0,099 n KCl), sowie der gleichen Lösung nach Zugabe eines Thymolblau-Kresolrotgemisches (20 mg TB + 10 mg KR je Liter) bestimmt, durch welche Luft von einem bestimmten CO_2-Gehalt durchperlte.

1b. Visuelle p_H-Bestimmung unter Verwendung verschiedener Indicatoren. Mit dem vorher erwähnten Feldapparat (mittels Vergleich mit dem Satze der Pufferlösung) wurden die p_H-Werte der Bicarbonatlösung mit Kresolrot (10 mg je Liter) und mit Thymolblau- und Kresolrotgemischen (6,66 mg TB + 3,33 mg KR je Liter und auch 20 mg TB + 10 mg KR je Liter) gemessen. Diese Lösungen wurden gleichzeitig von Luft verschiedener CO_2-Konzentration durchperlt und zwar in Durchperlungseinrichtungen, die hintereinandergeschaltet waren. Aus den Ergebnissen beider Versuche (Abb. 3) ist ersichtlich, daß die Streuung der experimentellen Werte die Fehlergrenze der p_H-Bestimmung nicht übersteigt.

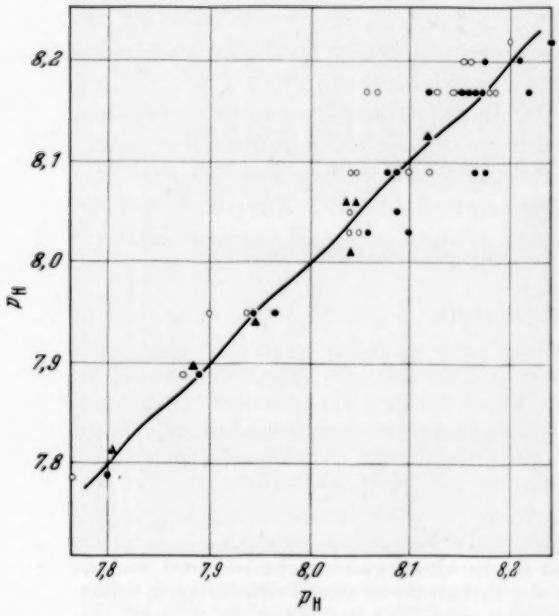


Abb. 3

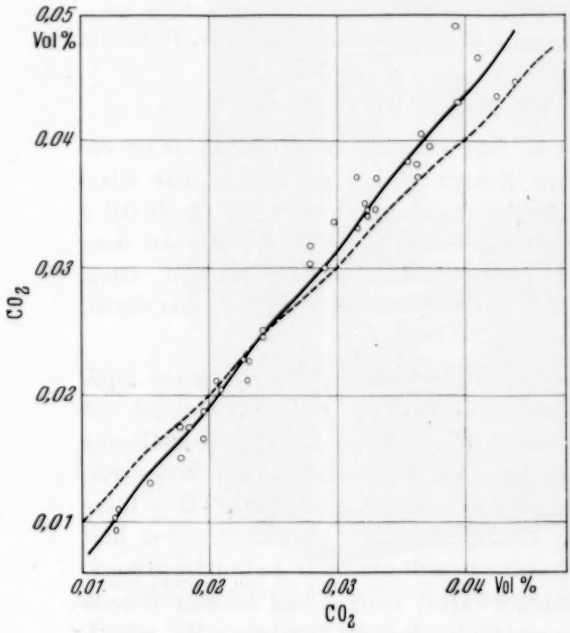


Abb. 4

2. Prüfung der Ergebnisse der Durchströmungsmethode mittels URAS. Zum Unterschied der Versuche von LIETH (1958), welcher die Möglichkeiten der Verwendung der colorimetrischen Methode feststellte, war es das Ziel des vorliegenden Vergleiches, die Zuverlässigkeit der praktischen Ergebnisse festzustellen, die wir mit dem von uns verwendeten Apparat gewinnen konnten. Darum haben wir uns auch im Laufe der Arbeit bemüht, Bedingungen einzuhalten, unter welchen man im Terrain zu arbeiten vermag (beispielsweise visuelles Abschätzen des p_H bei niedriger Lichtintensität). Luft, angesaugt aus der

Abb. 3. Ein Vergleich der p_H-Werte, ermittelt mit verschiedenen Indicatoren. a) Visuelle Bestimmung des p_H-Wertes mit Kresolrot in einer Konzentration von 10 mg je Liter (Ordinate) und mit Gemischen von Thymolblau und Kresolrot in Konzentrationen von 20 mg TB + 10 mg KR je Liter (●) und 6,66 mg TB + 3,33 mg KR je Liter (○) (Abszisse). b) Bestimmung des p_H-Wertes mittels des Kompensations-p_H-Meters bei Verwendung von Bicarbonatlösung ohne Indicator (Ordinate) und derselben Lösung mit einem Gemisch von 20 mg TB + 10 mg KR je Liter (▲)

Abb. 4. Vergleich der visuellen Durchströmungsmethode mit URAS. Konzentration von CO_2 in der Luft in Vol.-%, visuell colorimetrisch bestimmt (Abszisse) und mittels URAS (Ordinate). Der ideale Zusammenhang ist durch eine gestrichelte Gerade gekennzeichnet

Klimatisationskammer mit regulierter CO_2-Konzentration, wurde in 2 Ströme geteilt, deren einer durch URAS analysiert wurde, der zweite gleichzeitig mittels der colorimetrischen Durchströmungsmethode mit Hilfe des Freiland-Apparates. Als p_H-Indicator wurde ein Gemisch von 20 mg Thymolblau und 10 mg Kresolrot je Liter Bicarbonatlösung benützt, das sich unserer Ansicht nach für visuelle p_H-Bestimmungen am besten eignet. Es wurde ein schwaches Abweichen der festgestellten Werte von den URAS-Angaben beobachtet. Diese Abweichung erreicht im Durchschnitt bei einer Konzentration von 0,04 Vol.-% CO_2 etwa —8%, bei 0,03 Vol.-% CO_2 etwa —3% und bei 0,02 Vol.-% CO_2 etwa +4% des Sollwertes, also Werte, die die experimentellen Fehler nur wenig übersteigen (Abb. 4).

Besprechung der Ergebnisse

Über die Notwendigkeit einer genauen p_H-Bestimmung der Werte über 8,2 und damit also von der Notwendigkeit der Verwendung eines anderen Indicators als Kresolrot haben wir in der Einleitung kurz gesprochen. Gehen wir von der Voraussetzung aus, daß das assimilierende Blatt bei gasometrischen Durchströmungsmethoden in der Kammer aus der Kontrolluft etwa 25% CO_2 verbrauchen darf, damit im Blatte kein CO_2-Hungerzustand entsteht (beispielsweise Ničiporović 1955), so wird uns vor allem der Bereich zwischen p_H 8,1 (Normalluft) und p_H 8,3—8,4 (verarmte Luft) am meisten interessieren. Man vermag also nicht mit den Ansichten Lieths (1960) übereinstimmen, daß die p_H-Werte über 8,2 bei Anwendung der Methode nach Kauko nur in speziellen Fällen interessant sind. Lieths Erwägung ist nur im Hinblick auf seine Verwendung der colorimetrischen Methode zur Bestimmung des Kompensationspunktes sinnvoll, wobei es sich keineswegs um eine genaue Indikation des Endwertes handelt. Wichtig ist die zweite Bemängelung Lieths, daß Langes Formel bei der Verwendung anderer Indicatoren oder ihrer Gemische, bzw. einer anderen Konzentration als 10 mg Kresolrot je Liter offenbar nicht gilt. Seine Ansicht belegt Lieth durch einen Versuch, bei welchem er bei Verwendung von Kresolrot in Konzentrationen von 100 und 300 mg je Liter zu abweichenden Ergebnissen gelangte (Lieth 1958, Abb. 3). Hierbei ist es jedoch nötig im Auge zu behalten, daß Langes Formel an Bicarbonatlösung *ohne* jeglichen Indicatorzusatz festgestellt worden ist (Lange 1956, S. 51) und daß eine Beigabe von 100—300 mg nichtneutralisierten Indicators tatsächlich eine unverhältnismäßig hohe Dosis darstellt. Wenn wir in Erwägung ziehen, daß Kaukos Lösung eine verhältnismäßig hohe KCl-Konzentration enthält, dann kann der Fehler, welcher nach der Zugabe einer *kleinen* Menge eines auch nichtneutralisierten Indicators entsteht, die übrigen Fehler der Methode kaum übersteigen. Dies ist auch durch die Versuche belegt, die

im experimentellen Teil angegeben sind, aus denen klar hervorgeht, daß die Unterschiede zwischen den p_H-Werten, die mittels verschiedener Indicatoren festgestellt worden sind, den Rahmen einer experimentellen Fehlerbreite nicht übersteigen. Es ist allerdings möglich, daß die Abweichung der Angaben der colorimetrischen Bestimmung von den URAS-Werten mit dem Umschlag des angewandten Indicators zusammenhängt.

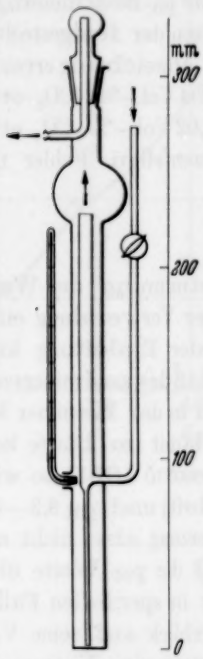


Abb. 5. Durchperlungseinrichtung für die photocolorimetrische CO_2-Bestimmung. Nähere Beschreibung im Text

a) Messungen des p_H-Wertes im Terrain. KAUKOS Methode der CO_2-Bestimmung in der Luft ist in ihrem Prinzip und in ihrer einfachen Durchführbarkeit besonders für Freilandarbeiten sehr geeignet. Es ist selbstverständlich, daß sie in bezug auf ihre Genauigkeit keineswegs mit modernen Ultrarot-Analysatoren konkurrieren kann (was auch LIETH 1958, S. 718, an ihr aussetzt). Unter Terrainbedingungen übertrifft sie dieselben jedoch nicht nur durch ihre Einfachheit, sondern vor allem auch durch die mögliche Anzahl der gleichzeitig analysierten Luftströme, worauf bei Freilandarbeiten ein besonderer Wert gelegt wird. In den von uns verwendeten Feldapparaten bewährte sich eine p_H-Bestimmung bei einem Vergleich der Farbe der Bicarbonatlösung mit der Farbe der Vergleichspufferlösungen in den Ampullen gegen eine weiße Reflektionstafel (s. Abb. 1). In nötigen Fällen ist es möglich, die Vergleiche auch ohne Einstellung der Luftdurchströmung zu ziehen, allerdings mit der Gefahr größerer Fehler. Bei genügender Abstufung des Puffersatzes zu je etwa 0,025 p_H und ausreichender Erfahrung kann man bei p_H-Abschätzungen eine Genauigkeit von $\pm$ 0,02—0,03 p_H erreichen. Bei Verwendung eines Gemisches von 20 mg Thymolblau und 10 mg Kresolrot je Liter Lösung wird diese Genauigkeit praktisch im ganzen benutzten Bereich von 7,8—8,4 p_H bewahrt.

b) Benutzung im Laboratorium. Im Laboratorium ist es sicherlich nicht allzu vorteilhaft, sich um einen Ersatz zuverlässiger Ultrarot-Analysatoren durch einfachere, weniger genaue Methoden zu bemühen. In manchen Fällen brauchen wir aber auch im Laboratorium eine Analyse oder doch wenigstens eine Kontrolle einer größeren Anzahl von Luftströmen. In diesem Falle ist dann die Verwendung der colorimetrischen Methode am Platze. Ähnliche Durchperlungseinrichtungen wie beim

Freiland-Apparat (deren genauere Ausmaße man aus ČATSKÝ u. SLAVÍK 1960, S. 110, ersehen kann) mit visueller p_H-Bestimmung sind beispielsweise für eine Kontrolle der CO_2-Konzentration in der Luft bei gewissen Versuchen sehr geeignet. In solchen Fällen hat sich der Vergleich der Farbe der Bicarbonatlösung mit den Pufferlösungen vor der weißen Fläche einer Leuchtstoffröhre bewährt. Weitere Möglichkeiten bestehen bei gemeinsamer Verwendung der colorimetrischen Methode mit URAS, worauf schon LIETH (1958) hingewiesen hat. In diesem Falle ist es jedoch

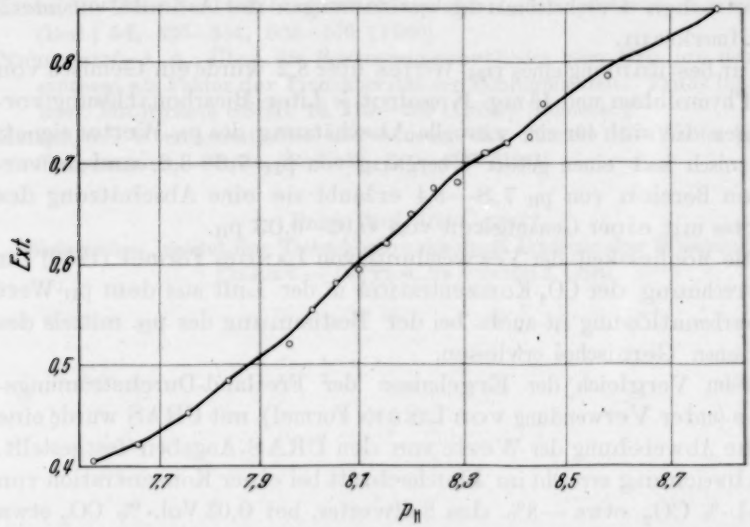


Abb. 6. Zusammenhang von Extinktion (Ordinate) und p_H-Werten der Bicarbonatlösung (Abszisse) bei Verwendung des Durchperlungsgefäßes (Abb. 5) und eines Gemisches von 20 mg Thymolblau und 10 mg Kresolrot je Liter (Photocolorimeter nach Dr. B. LANGE, Modell IV, Grünfilter)

besser, keine weniger zuverlässige visuelle p_H-Bestimmung zu machen, sondern ein objektives Photocolorimeter zu verwenden. Bei unseren Arbeiten verwenden wir dazu Spezial-Durchperlungseinrichtungen (Abb. 5). Im Interesse einer leichteren Herstellung und einer leichteren Verwendbarkeit an weniger gut ausgestatteten Forschungsstellen sind diese Durchperlungseinrichtungen so konstruiert, daß ihr unterer Teil von einer Rundcuvette für die üblichen Photocolorimeter nach Dr. B. LANGE gebildet wird. Die Luft, die das Durchperlungssystem passiert, hebt die Bicarbonatlösung durch die Mittelröhre empor, im Obergefäß fällt diese Lösung zurück und sinkt durch den Mantel in die Cuvette. Der Kreislauf der Lösung ist sehr schnell, so daß ein Gleichgewicht zwischen Luft und Lösung genauso schnell eintritt, wie bei der direkten Durchperlung der Luft (d.h. in 5—10 min). Ein dünnes Glasröhrchen in der Cuvette ändert den Extinktionswert nicht einmal beim Umdrehen der

Cuvette im Colorimeter. Die Extinktionsmessung kann man kontinuierlich ohne Unterbrechung des Luftstromes durchführen. Den Zusammenhang zwischen dem p_H-Wert und der Extinktion bei Verwendung der beschriebenen Durchperlungseinrichtung und des Gemisches von 20 mg Thymolblau und 10 mg Kresolrot je Liter zeigt Abb. 6.

Zusammenfassung

1. Die Arbeit macht auf die mangelnde Eignung von Kresolrot bei colorimetrischen Durchströmungsbestimmungen der Assimilationsintensität aufmerksam.

2. Zur Bestimmung eines p_H-Wertes über 8,2 wurde ein Gemisch von 20 mg Thymolblau und 10 mg Kresolrot je Liter Bicarbonatlösung vorgeschlagen, die sich für eine visuelle Abschätzung des p_H-Wertes eignet. Das Gemisch hat einen guten Übergang von p_H 7,6—8,6, und im verwendeten Bereich von p_H 7,8—8,4 erlaubt sie eine Abschätzung des p_H-Wertes mit einer Genauigkeit von 0,02—0,03 p_H.

3. Die Möglichkeit der Verwendung von LANGEs Formel (1956) für eine Berechnung der CO_2-Konzentration in der Luft aus dem p_H-Wert der Bicarbonatlösung ist auch bei der Bestimmung des p_H mittels des angegebenen Gemisches erwiesen.

4. Beim Vergleich der Ergebnisse der Freiland-Durchströmungsmethode (unter Verwendung von LANGEs Formel) mit URAS wurde eine schwache Abweichung der Werte von den URAS-Angaben festgestellt. Diese Abweichung erreicht im Durchschnitt bei einer Konzentration von 0,04 Vol.-% CO_2 etwa —8% des Sollwertes, bei 0,03 Vol.-% CO_2 etwa —3% und bei 0,02 Vol.-% CO_2 etwa +4%, zeigt also Werte, die die experimentellen Fehler nur wenig überhöhen.

5. Es werden die Möglichkeiten der Verwendung der colorimetrischen Methode zur Bestimmung der CO_2-Konzentration im Terrain und im Laboratorium diskutiert, und es wird eine Durchperlungseinrichtung für die photocolorimetrische p_H-Bestimmung ohne Unterbrechung der Luftströmung beschrieben.

Herrn Dr. BOHDAN SLAVÍK bin ich für viele Diskussionen der vorliegenden Arbeit und für die freundliche Durchsicht des Manuskripts sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

ÅLVIK, G.: Über Assimilation und Atmung einiger Holzgewächse im westnorwegischen Winter. Meddel. Nr 22 fra Vestlandets Forstlige Forsøkstation **6**, 1—266 (1939).

ČATSKÝ, J., u. B. SLAVÍK: Eine neue Anwendung der CO_2-Bestimmung nach KAUKO zu Assimilationsmessungen. Planta (Berl.) **51**, 63—69 (1958).

ČATSKÝ, J., u. B. SLAVÍK: Freilandapparat zur Bestimmung der Intensität der Photosynthese. Biol. Plant. (Praha) **2**, 107—112 mit engl. Zus.fass. (1960). [Russisch.]

FRENZEL, B.: Einige Bemerkungen zu der CO_2-Bestimmungsmethode nach ÅLVIK. Planta (Berl.) **46**, 447—466 (1955).

KAUKO, Y.: Zur Bestimmung der Kohlensäure in der Luft mit Hilfe von p_H-Messung. Angew. Chem. **47**, 164—167 (1934).

KAUKO, Y.: Ein Apparat zur potentiometrischen Bestimmung der Luftkohlensäure. Angew. Chem. **48**, 539—540 (1935).

LANGE, O. L.: Zur Methodik der kolorimetrischen CO_2-Bestimmung nach ÅLVIK. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 49—60 (1956).

LIETH, H.: Grenzen und Anwendungsmöglichkeiten der colorimetrischen CO_2-Bestimmung. Planta (Berl.) **51**, 705—721 (1958).

LIETH, H.: Über den Lichtkompensationspunkt der Landpflanzen. I. u. II. Planta (Berl.) **54**, 530—554, 555—576 (1960).

NIČIPOROVIČ, A. A.: Über die Bestimmungsmethoden beim Studium der Photosynthese als Faktor der Produktivität der Kulturpflanzen. Trudy Inst. Fiziol. Rast. Timirjazeva SSSR. **10**, 210—249 (1955). [Russisch.]

ZELLER, O.: Über Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. Planta (Berl.) **39**, 500—526 (1951).

Prom. Biol. JIŘÍ ČATSKÝ,
Biologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften,
Praha 6 — Dejvice, Na cvičišti 2, ČSR.

Planta 55, 390—423 (1960)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ÜBER BEZIEHUNGEN DER EKTODESMEN ZUR STOFFAUFNAHME DURCH BLÄTTER

I. Mitteilung

BEOBACHTUNGEN AN *PLANTAGO MAJOR* L.*

Von

WOLFGANG FRANKE

Mit 32 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Juli 1960)

I. Einleitung

Die Entdeckung von Plasmodesmen in den Außenwänden von Epidermiszellen der Blätter (SCHUMACHER u. HALBSGUTH 1939, SCHUMACHER 1942) und die Bestätigung ihrer Existenz in späteren Arbeiten von SCHUMACHER und seinen Schülern (LAMBERTZ 1954, SCHUMACHER u. LAMBERTZ 1956, SCHNEPF 1959, SIEVERS 1959) hat verständlicherweise eine Reihe von Problemen aufgeworfen. Insbesondere ist die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser jetzt als Ektodesmen bezeichneten Gebilde gestellt worden. Ihre Lokalisation in den Außenwänden läßt vermuten, daß sie Verbindungen zwischen den Protoplasten der Epidermiszellen oder der ganzen lebenden Pflanze und der Außenwelt darstellen. Insofern könnten sie als Reizüberträger (SCHUMACHER u. LAMBERTZ 1956) oder auch als Vermittler für den Stoffaustausch sowohl von der Blattoberfläche in die Zelle hinein als auch in umgekehrter Richtung dienen.

Der Nachweis der Außenwandplasmodesmen war lange Zeit von Zweifeln der Entdecker selbst begleitet gewesen. Doch die letzten Untersuchungen, die sich nun auch anderer Methoden als der anfangs allein bewährten Sublimatmethode bedienten, insbesondere das Jod-Silber-Verfahren von SCHNEPF (1959), die elektronenoptischen Aufnahmen von SCHNEPF und die Bestätigung der von ULLRICH schon früher gemachten Beobachtung der Ektodesmen mittels des Polarisationsmikroskopes (SIEVERS 1959) haben diese Zweifel an der Existenz und an der Vitalität der Strukturen und die Befürchtung, es handele sich um Kunstprodukte, zerstreut. Die Frage nach der Funktion der Außenwandplasmodesmen dagegen ist über das Stadium von Hypothesen noch nicht hinausgekommen.

---

* Herrn Professor Dr. HERMANN ULLRICH, Bonn, zu seinem 60. Geburtstag gewidmet.

Die mehrfach vorgetragene Vermutung, daß auf die Blätter aufgesprühte Lösungen unter Vermittlung der Ektodesmen absorbiert und ins Gewebeinnere transportiert werden, erscheint zwar plausibel, ist jedoch noch nicht bewiesen worden. Allerdings besteht heute einhellige Klarheit darüber, daß Lösungen und Wasser von Blättern aufgenommen oder ausgeschieden werden können. Nicht gesichert ist aber der Weg, auf dem die Stoffe in die Epidermiszellen bzw. die Gewebe eindringen oder sie verlassen. Die Beteiligung der Ektodesmen an solchen Vorgängen konnte bestenfalls nur vermutet werden (SCHUMACHER u. LAMBERTZ 1956, FRANKE 1957, BODE 1958, SCHNEPF 1959, KERLING 1959)[1].

Die Frage nach der Funktion der Ektodesmen bedarf jedoch aus theoretischen und praktischen Gründen einer Klärung. Ich habe daher eine Untersuchungsreihe begonnen, über deren erste Befunde im folgenden berichtet werden soll. Für das Studium der oberirdischen Stoffaufnahme hatten sich die großen Blätter von *Plantago major* als geeignet erwiesen. In der ersten Mitteilung sollen nun Vorkommen und Verteilung der Ektodesmen in den Blättern dieser Pflanze, ihre gestaltliche Ausbildung bei verschiedenen Methoden und schließlich Beziehungen zu einer Funktion als Transportbahn untersucht werden.

II. Versuche

1. Methoden

Bezüglich der Ektodesmennachweismethoden habe ich hauptsächlich die in der Literatur bereits beschriebenen Verfahren angewendet, für einige Versuche jedoch abgeänderte Gemische benutzt. Zur Erleichterung der Darstellung führe ich für die verschiedenen Varianten Kennbuchstaben ein:

A/1. Das Sublimatverfahren mit Pyoktaninfärbung (LAMBERTZ 1954, SCHNEPF 1959).

A/2. Blätter 15 Std lediglich mit gesättigter $HgCl_2$-Lösung bei 38°C im Thermostat fixiert.

A/3. Blätter 15 Std in Gilsongemisch mit nur 1 g Sublimat auf 40 ml Lösung bei 38°C fixiert.

A/4. Blätter 15 Std mit gesättigter Sublimatlösung + 2 g Oxalsäure auf 40 ml Lösung bei Zimmertemperatur fixiert.

A/5. Blätter 15 Std mit gesättigter Sublimatlösung + 1 ml HNO_3 (65%) auf 40 ml Lösung bei 38°C fixiert.

In A/2 bis A/5 unterblieben die Waschung mit Alkohol und die Nachbehandlung mit Jodkalium und Pyoktanin.

B. Die Jod-Silber-Methode (SCHNEPF 1959).

C/1. Das Silberverfahren: Unbehandelte Blätter oder solche, die zuvor über 4—6 Std auf eine Ascorbinsäure-Lösung (10^{-2}) gelegt worden waren, wurden bei Tages- oder Lampenlicht für 6 Std mit einer 5%igen ammoniakalischen Silbernitratlösung behandelt, dann geschnitten und eventuell mit NaCN zur Aufhellung nachbehandelt.

[1] Angaben von NAUNDORF (1959), wonach die Aufnahme von Nährlösungen durch die Ektodesmen als bewiesen angesehen wird, beruhen auf einem Mißverständnis meiner Arbeit (FRANKE 1957).

C/2. Dasselbe in 1%iger ammoniakalischer Silbernitratlösung.

C/3. Dasselbe wie in C/1 nach vorausgegangener Fixierung über 5 Std in einer Lösung aus 40 ml H_2O + 1 ml HNO_3 (65%).

C/4. Dasselbe wie in C/3, doch nur Zusatz von 0,7 ml HNO_3.

Abb. 1. Ektodesmen an der Blattunterseite am Übergang der Spreite in die Blattrippe (Querschnitt, Sublimatmethode, 640mal)

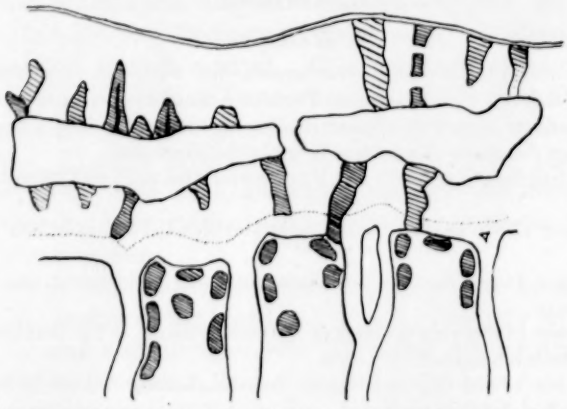


Abb. 2. Verschiedene Formen von Ektodesmen (oben rechts) und Innenwandplasmodesmen (unten). Abbauformen oben links (Querschnitt)

Hierzu kann bemerkt werden, daß wir bezüglich der von LAMBERTZ (1954), SCHNEPF (1959) und SIEVERS (1959) gemachten Erfahrungen über Konzentrationen der Lösungsmittel und Reagentien und über Verfahrensbedingungen, soweit sie überprüft wurden, keine Abweichungen festgestellt haben.

2. Nachweis der Ektodesmen

a) Sublimatverfahren. Zerlegt man unbehandelte frische Blätter von *Plantago major* mit dem Gefriermikrotom (CM, Jung, Heidelberg) in

Schnitte von etwa 40 μ, so sind in den Epidermisaußenwänden keinerlei gesonderte Strukturen zu erkennen. Bei Anwendung des Verfahrens A/1 dagegen werden in diesen Wänden Gebilde sichtbar, die nach Form und Lokalisation als Ektodesmen angesprochen werden müssen. Neben bandförmigen Ektodesmen, die an den Enden oft etwas verbreitert sind,

Abb. 3

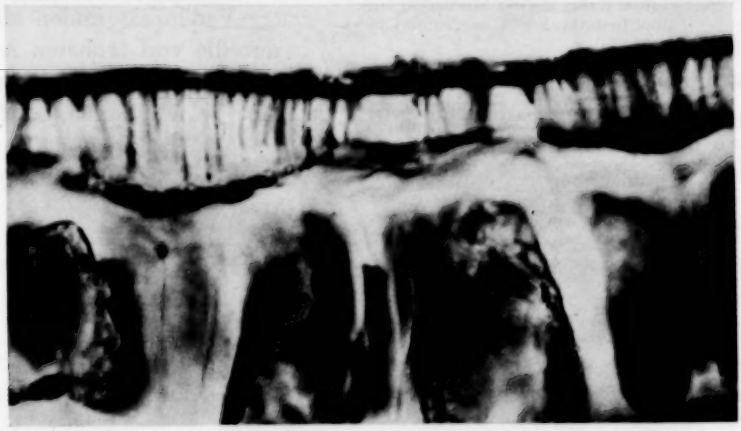


Abb. 4

Abb. 3. Keilförmige Ektodesmen mit Anhängseln (Blattquerschnitt, Sublimatmethode, 640mal)

Abb. 4. Fadenförmige Ektodesmen (Frühjahrsblatt, Querschnitt, Sublimatmethode, 640mal)

herrschen vor allem keil- oder kegelförmige vor, die sich von der Cuticula her gegen das Zellumen verjüngen. Teils reichen sie bis zum Protoplasten der Epidermiszellen, teils enden sie verkürzt in der Mitte der Wand oder erscheinen zuweilen in mehrere Stücke zerbrochen (Abb. 1 und 2). Vereinzelt kann man bei den verkürzten Ektodesmen parallel zur Zellwandschichtung verlaufende Anhängsel beobachten (Abb. 3). Sie scheinen die von LAMBERTZ (1954, S. 169) gegebene Erklärung des Zerreißens der Ektodesmen durch Quellung der Zellwand zu bestätigen. Denn es sieht fast so aus, als ob zwischen die auseinanderquellenden Schichten der Zellwand Material der Ektodesmen eingetreten wäre, das sich dann ebenso zu färben vermag wie die Ektodesmen selbst und die Anhängsel so sichtbar werden

läßt. Die in den Blättern von *Primula*arten dominierenden dünnen faden- oder stäbchenförmigen Ektodesmen treten bei Sommerblättern von *Plantago major* zahlenmäßig zurück und sind vorzugsweise auf die Epidermen unter den großen Nerven beschränkt. Häufiger scheinen sie in Frühjahrsblättern vorzukommen, wo sie dann in dichten Büscheln teils als Einzelfäden, teils in Doppelfadenform die Wand durchsetzen und oft mit einem Endknötchen am Übergang zum Protoplasten ausgerüstet sind (Abb. 4).

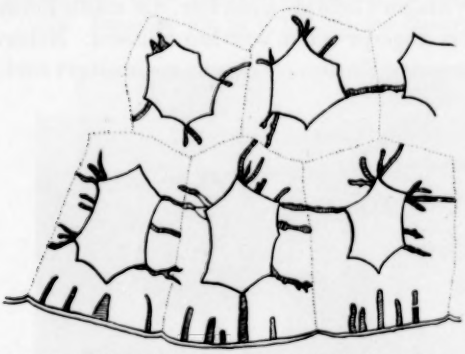


Abb. 5. Ektodesmen und Innenwandplasmodesmen in epidermalen und subepidermalen Zellen im Bereich unter einem Mediannerven (halbschematischer Querschnitt)

Vereinzelt finden sich ferner die von früheren Autoren beschriebenen sog. Abbauformen, meist keilförmige Gebilde, die vom Lumen ausgehen und nur kurz in die Wand ragen, ohne die Cuticula zu erreichen (Abb. 2 und 16).

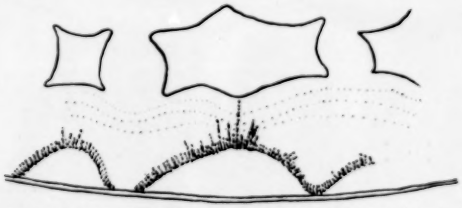


Abb. 6. Ektodesmengruppe in der Epidermis unter dem Blattmedianus (Querschnitt, Jod-Silber-Verfahren)

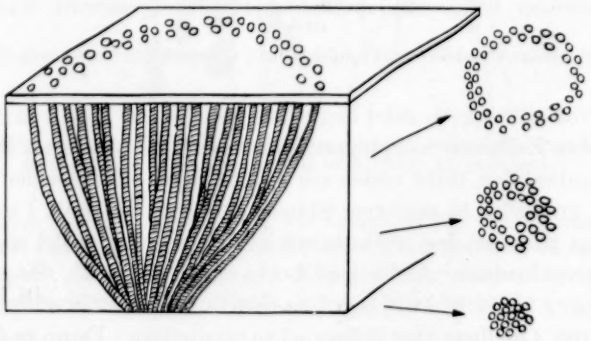


Abb. 7. Schematische Darstellung einer Ektodesmengruppe im Querschnitt und drei Aufsichtseinstellungen in verschiedener Höhe (Jod-Silber-Verfahren)

Innenwandplasmodesmen sind mit der Sublimatmethode in früheren Arbeiten gelegentlich dargestellt worden. Bei unserem Objekt werden

derartige Plasmodesmen vor allem im Bereich unter den größeren Blattnerven und unter den Kegelhaaren durchaus häufig, ja zum Teil geradezu regelmäßig sichtbar. Vielfach sind diese teilweise verzweigten Strukturen nicht durch die ganze Wand zu verfolgen und treten oft in nach

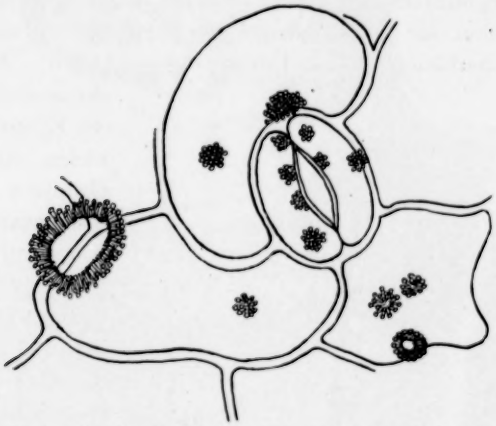


Abb. 8. Aufsicht auf die Epidermis mit Schließzellenpaar, Ektodesmengruppen (Jod-Silber-Verfahren)

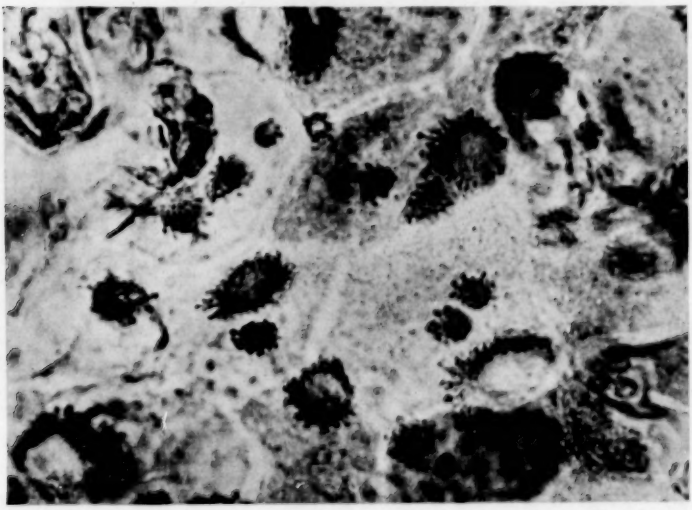


Abb. 9. Aufsicht auf die Epidermis mit Ektodesmengruppen (Jod-Silber-Verfahren, 640mal)

mehreren Seiten gerichteten Büscheln auf (Abb. 5). Einzelne von ihnen kommunizieren mit entsprechenden Bildungen der benachbarten Zellen und stellen damit eine Plasmabrücke bis zum Lumen der Palisaden- oder Schwammgewebezellen her (Abb. 2).

b) Jod-Silber-Methode. In Anwendung dieser von SCHNEPF (1959) beschriebenen Methode (B) konnten wir die gleichen Erfahrungen wie

dieser Autor machen. Die Ektodesmen treten unter der tief dunkelbraun bis schwarz gefärbten Cuticula und der ebenfalls diffus dunklen äußeren Wandschicht in dichten Büscheln stets feiner Fäden mit gekörnelter Struktur hervor. Vielfach sind sie wie die Fransen eines Teppichs an der Cuticula angeheftet und enden teils am Lumen, teils in der Wand. Häufig erscheinen sie zu halbkugeligen Gruppen vereint, aus denen einzelne Körnchenfäden bis zum Lumen ragen (Abb. 6). Aus dem mikroskopischen Bild entsteht der Eindruck, als ob die vielen Einzelfäden der Gruppen wie auf einem Kegelmantel oder einer Kalottenhülle dicht gepackt sind, während der Kegel- bzw. Kalotteninnenraum frei von Strukturen ist (Abb. 7). Dabei streben die Einzelfäden gegen das Lumen zu zusammen, wie wenn sie an einem oder mehreren dicht beieinanderliegenden Orten in das Lumen münden würden. Diese ebengeschilderte Gruppenanordnung wird besonders deutlich in Aufsichtsbildern (Abb. 8 und 9). Sind die Ektodesmen aber nicht zu Gruppen vereint, so erscheinen sie in Aufsichtsbildern mehr oder weniger isoliert als Punkte gleichmäßig über die Periklinen verteilt. Oft sieht es so aus, als wären die Ektodesmen Röhrchen, deren Hohlraum deutlich von einer Wandung umgeben ist.

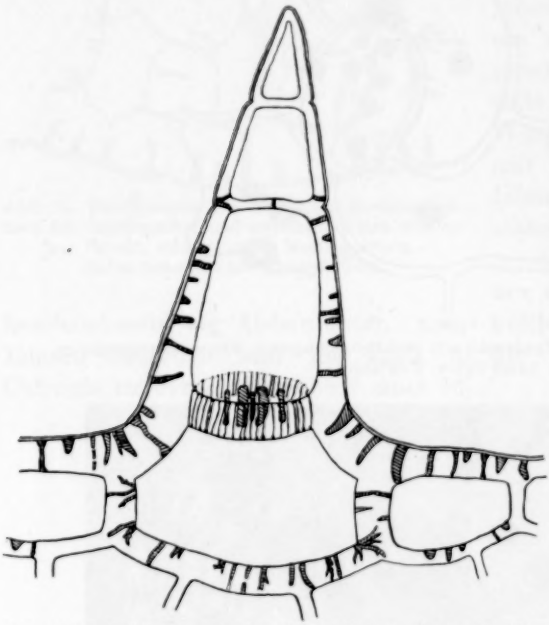


Abb. 10. Halbschematische Darstellung eines Kegelhaares und der angrenzenden Zellen mit Ektodesmen und Plasmodesmen

c) Silbermethode. 1956 beschrieben SCHUMACHER u. LAMBERTZ einen allerdings nur einmal gelungenen Ektodesmennachweis mittels 1%iger ammoniakalischer Silbernitratlösung (C/1, C/2). In Anwendung dieser Methode gelang es jedoch bei *Plantago major* in zahlreichen Versuchen bisher nicht, Ektodesmen darzustellen.

Da bei dieser Methode die Zellwände sehr wenig gequollen waren, fixierten wir die Blätter nach der Ascorbinsäurebehandlung, aber noch vor der Einwirkung der Silbersalzlösung, mit einer HNO_3-Lösung (C/3 und C/4). Nach dieser Behandlung wurden streifige Strukturen in Zellwänden sichtbar, die jedoch nicht als Ekto-

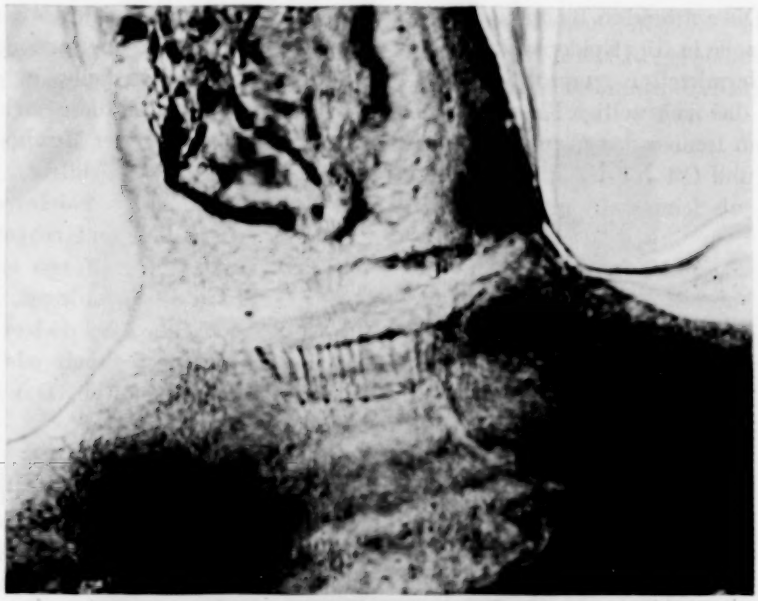


Abb. 11

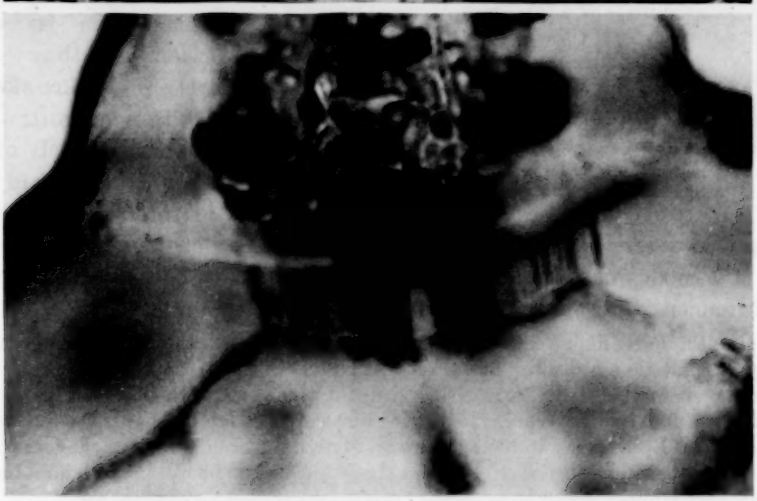


Abb. 12

Abb. 11. Kegelhaar mit Plasmodesmenkranz (Krönchen) in der Wand zwischen Fußzelle und Haarbasiszelle (Blattquerschnitt, Silbermethode, 640mal)

Abb. 12. Kegelhaar mit Krönchen und zentralen Plasmodesmen in der Wand zwischen Fußzelle und Haarbasiszelle (Querschnitt, Sublimatmethode, Ölimmersion 1600mal)

desmen identifiziert werden konnten. Denn nach Aufhellung der schwarzen bis braunen Niederschläge mit NaCN waren die Streifen nicht mehr erkennbar. Dagegen konnten wiederholt Innenwandplasmodesmen in den Wänden der Fußzellen der mehrzelligen Kegelhaare dargestellt werden. Diese sind, wie später noch zu beschreiben ist, auch mit der Sublimatmethode nachweisbar.

Die auf beiden Blattseiten vorkommenden Kegelhaare sind mit einer Fußzelle in die Epidermis eingebettet, die gegenüber den angrenzenden Epidermiszellen vergrößert ist (Abb. 10). Über der Fußzelle erhebt sich das mehrzellige Kegelhaar mit der Basiszelle. In der diese beiden Zellen trennenden Wand finden sich nun bei Anwendung der Methoden C/3 und C/4 häufig auffallend zarte plasmodesmenartige Gebilde. Sie sind als feine schwarze Körnchenlinien ausgebildet, enden beiderseits in verdickten Knötchen und sind in Form eines Ringes angeordnet. Ich bezeichne sie daher in ihrer Gesamtheit als ein Krönchen (Abb. 10 u. 11).

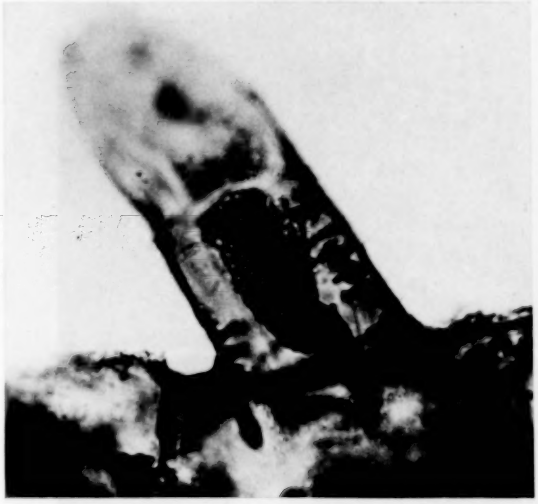


Abb. 13. Basiszelle eines Kegelhaares mit Ektodesmen (Blattquerschnitt, Sublimatmethode, 640mal)

3. Verteilung der Ektodesmen im Blatt

Mit den vorstehend beschriebenen Methoden werden Ektodesmen und Plasmodesmen in den Wänden sichtbar gemacht. Die mikroskopische Betrachtung erschöpft sich jedoch nicht mit der Feststellung der Strukturen allein, sondern es werden auch Unterschiede in der Verteilung der Ektodesmen und Plasmodesmen deutlich, sei es ein massiertes oder ein spärliches Vorkommen in bestimmten Bezirken des Blattes.

Mit dem Jod-Silber-Verfahren werden allgemein zahlreiche Ektodesmen sichtbar gemacht, teils einzeln, teils in den schon beschriebenen Gruppen. Sie erscheinen in den Periklinen der Epidermiszellen ebenso wie in den Schließzellen, über den Antiklinen und in den Wänden der Kegelhaare. Infolge der häufigen Schwarzfärbung der Epidermiswände bei dieser Methode haben wir jedoch von einer weitere Verwendung abgesehen und uns des für die Verteilungsstudien günstigeren Sublimatverfahrens bedient.

Im Verlaufe der Untersuchungen ergab sich zum Teil in Bestätigung früherer Befunde von anderen Autoren an verschiedenen Pflanzenarten, daß in einigen Zellen oder Blattbezirken Ektodesmen regelmäßig nachzuweisen sind, selbst wenn in den übrigen Bezirken keine oder nur sehr wenige Ektodesmen sichtbar gemacht werden können (vgl. SIEVERS 1959, S. 274ff.). Unter solchen durch beständig reicheres Vorkommen von Ektodesmen ausgezeichneten Blattorten seien zuerst die Epidermen unter, über und beiderseits neben den größeren Nerven erwähnt (vgl.

Sievers 1959, S. 283). In der stets stark gequollenen Zellschicht unter den herausgewölbten Nerven sind die Ektodesmen in der Regel stäbchenförmig ausgebildet und stehen in großer Zahl dicht beieinander (Abb. 5).

Abb. 14

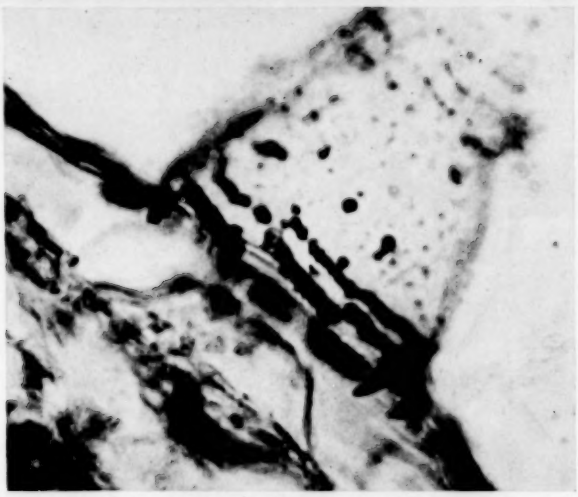


Abb. 15

Abb. 14. Plasmodesmen in der Fußzelleninnenwand eines Kegelhaares (Blattquerschnitt, Sublimatmethode, 640mal)

Abb. 15. Ektodesmen in schraubenförmigen Reihen an einem Kegelhaar und kräftige Ektodesmen in der Fußzelle (Blattquerschnitt, Sublimatmethode, 640mal)

Demgegenüber sind sie in den beiderseits anschließenden unteren Epidermen keilförmig gestaltet (Abb. 1). In der oberen Epidermis über den Nerven erscheinen sie meist grob keilförmig und auch etwas spärlicher.

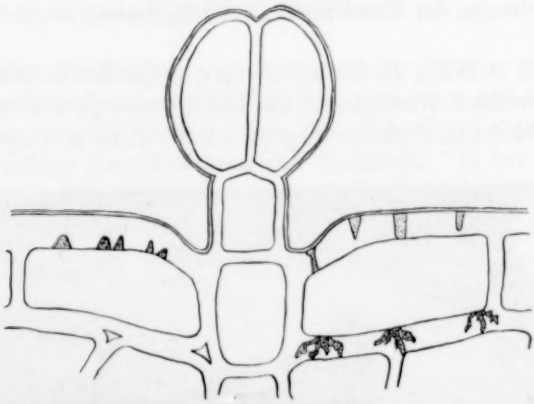


Abb. 16

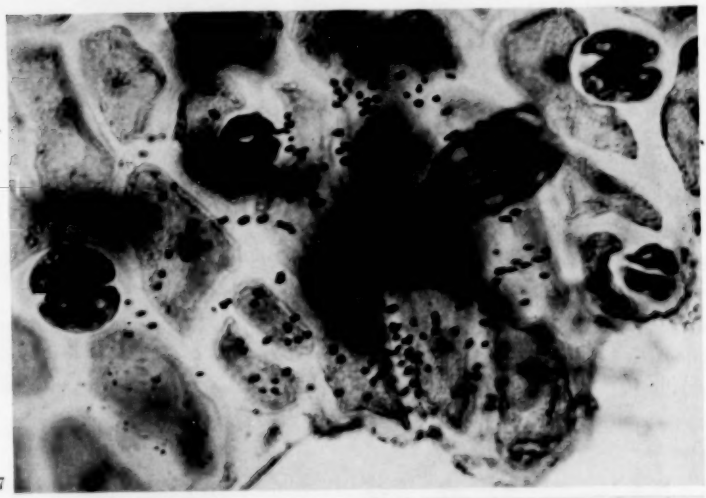


Abb. 17

Abb. 18

Abb. 16—18 (Legenden S. 401)

Ebenso fehlen Ektodesmen fast niemals in den Schließzellen. Sie finden sich in allen Wänden und können auch gegen den Vor- und Hinterhof zu wie gegen den Spalt selbst und die Atemhöhle gerichtet sein (Abb. 21). Die meist kurzen und dickkegelförmigen Gebilde drängen sich aber zum Teil so stark, daß sie gewöhnlich nur schwer erkennbar sind. Dünne fadenförmige Ektodesmen, wie sie SCHUMACHER (1942, S. 533, Fig. 4), LAMBERTZ (1954, S. 163, Abb. 7) und SIEVERS (1959, S. 277, Abb. 9) von anderen Objekten abgebildet haben, konnte ich bisher nicht beobachten.

Besonders auffällig ist das regelmäßige, reiche Vorkommen in den Kegelhaaren und den unmittelbar benachbarten Epidermiszellen. Kräftig gefärbte stäbchen- und keilförmige Ektodesmen durchsetzen zum Teil in großer Anzahl die Wände der Haarbasiszelle (Abb. 13). Sie sind häufig zu Linien angeordnet, die teils kontinuierlich, teils von Lücken unterbrochen in Schraubenwindungen die Basiszelle umlaufen (Abb. 15). In den basalwärts anschließenden Außenwänden der Fußzellen erreichen die Ektodesmen besondere Größe und sind vielfach hornartig gebogen (Abb. 10 und 15). Daneben werden mit dem Sublimatverfahren auch zarte dünne Linien in der Wand zwischen Basis- und Fußzelle sichtbar, ringförmig angeordnet (Abb. 12), die also dem schon beschriebenen Krönchen entsprechen (vgl. Abb. 11). Innerhalb der von den Krönchenstrukturen freien Zellwand sind ferner oftmals einige große, kräftig gefärbte Innenplasmodesmen wahrzunehmen (Abb. 12 und 23). Sehr regelmäßig sind die Innenwände der Fußzelle von zahlreichen Innenplasmodesmen durchsetzt. Sie kommunizieren zum Teil mit Plasmodesmen der benachbarten Epidermis-, Palisaden- oder Schwammgewebezellen (Abb. 10 und 14). Das immer wiederkehrende Bild von Ektodesmen und Plasmodesmen erweckt den Eindruck eines regelrechten Systemes von plasmatischen Verbindungen zwischen der Außenwelt über die Haarzellen und den tieferliegenden Geweben, das in Abb. 10 halbschematisch dargestellt ist.

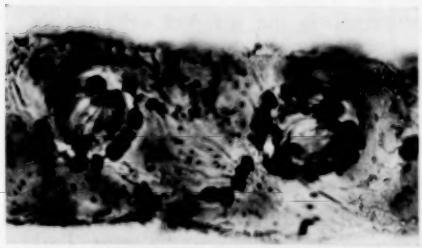
Neben den Kegelhaaren finden sich bei *Plantago major* auf beiden Blattseiten Köpfchenhaare. Sie erheben sich auf einer gegenüber den benachbarten Epidermiszellen wesentlich schmäleren Fußzelle und bestehen aus einer kurzen Stielzelle und dem zweizelligen Köpfchen (Abb. 16 und 17). In den Wänden der Haarzellen selbst sind keine

Abb. 16. Halbschematische Darstellung eines Köpfchenhaares und der angrenzenden epidermalen und subepidermalen Zellen mit Ektodesmen (oben rechts), krallenartigen Strukturen (Plasmodesmen?) in der Innenwand (unten rechts) und Abbauformen (oben links)

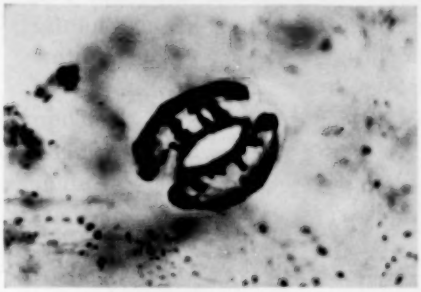
Abb. 17. Köpfchenhaar in Aufsicht. Gehäuftes Vorkommen von Ektodesmen in den Epidermiszellen um dieses Haar herum (Sublimatmethode, 400mal)

Abb. 18. Epidermiszelle, einem Köpfchenhaar unmittelbar benachbart, mit ballig-kristallinen Intrusionen nach Sublimatfixierung A/5 (Querschnitt, 640mal)

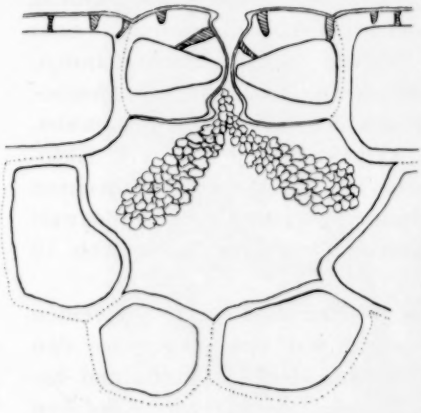
Ektodesmen nachzuweisen. Wohl aber sind die um die Fußzelle unmittelbar herum anschließenden Epidermiszellen mit zahlreichen kräftigen keilförmigen Ektodesmen ausgerüstet (Abb. 16 und 17). Mögen



19

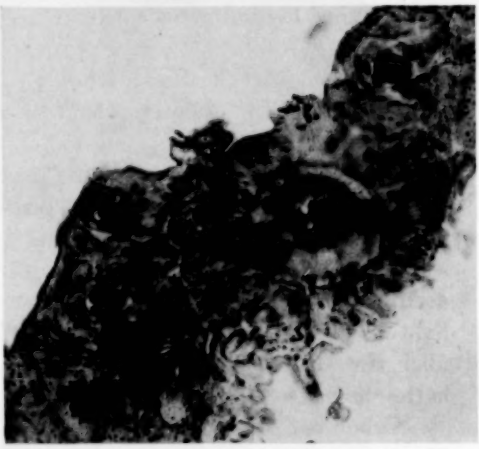


20



21

22



23

Abb. 19. Schließzellen in Aufsicht. Anordnung der Ektodesmen an den Polen der Spalten und entlang den Rückwänden (Sublimatmethode, 640mal)

Abb. 20. Spaltöffnungen mit Ektodesmen an den Cuticularleisten (Aufsicht, Sublimatmethode, 640mal)

Abb. 21. Halbschematischer Querschnitt durch eine Spaltöffnung mit Ektodesmen in den Schließzellen. An den Spalt anschließend eingedrungenes und auskristallisiertes Sublimat in zopfartiger Ballung in der Atemhöhle (Querschnitt, Fixierung A/5)

Abb. 22. Schrägaufsicht auf ein geköpftes Kegelhaar, an der Basis von Ektodesmenkränzen umsäumt (Sublimatmethode, 640mal)

Abb. 23. Verteilung der Ektodesmen um ein geköpftes Kegelhaar (Aufsicht, Sublimatmethode, 160mal)

die Ektodesmen sonst weitgehend fehlen, um diese Köpfchenhaare herum treten sie stets in Erscheinung.

Hatten wir bisher Blattquerschnitte betrachtet, so sollen nun Flächenschnitte bzw. abgehobene Epidermen studiert werden. Sie gewähren in besonderem Maße Einblick in die Verteilung der Ektodesmen über das Blatt. Es ist immer wieder überraschend zu sehen, daß Bezirke mit großer Dichte der nun punktförmig erscheinenden, mehr oder weniger gleichmäßig verteilten oder nur über den Lumina der Zellen massierten Ektodesmen mit solchen abwechseln, in denen Ektodesmen weitgehend fehlen. In ihnen sind freilich fast immer noch Ektodesmen in den Schließzellen zu entdecken. Vorwiegend sind sie an den Spalten lokalisiert, wobei sie entweder an den Polen der Spalten gedrängt stehen oder an den Cuticularleisten entlang den Spalt umsäumen (Abb. 19). Oft reichen sie dann wie Finger gegen das Lumen der Schließzellen (Abb. 20 und 21) (vgl. auch LAMBERTZ 1954, S. 163, Abb. 6, und SIEVERS 1959, S. 276, Abb. 7b). Häufig sind sie aber auch in einem Ring entlang den Rückwänden der Schließzellen angeordnet (Abb. 19). Außer den Schließzellen enthalten in derartigen ektodesmenarmen Bezirken die die Fußzellen der Kegel- und Köpfchenhaare umgebenden Epidermiszellen einige bis viele Ektodesmen. Es fällt besonders auf, daß diese Epidermiszellen sternförmig um die Fußzellen angeordnet und die Ektodesmen dann vielfach ausschließlich auf diese Zellen beschränkt sind (Abb. 23 und 17).

In den ektodesmenreichen Blattfeldern sind die Ektodesmen entweder annähernd regelmäßig verteilt, aber auch dann noch mit deutlich lokaler Anhäufung an den Schließzellen und Haaren, oder sie sind oft in Reihen oder Ketten angeordnet. Manchmal verlaufen diese Ketten schnurgerade über die Zellen hinweg ohne Beziehungen zu Zellgrenzen (Abb. 24), häufiger liegen sie direkt über den Antiklinen oder unmittelbar benachbart darüber (Abb. 25 und 26) und folgen dem Verlaufe der Antiklinen. Mehrfach konnte ich beobachten, daß die Ektodesmenreihen über den Antiklinen parallel zur Richtung der Längsachsen der Spaltöffnungen, seltener senkrecht dazu orientiert sind (Abb. 24 und 26). Die in den Antiklinen erscheinenden Ektodesmen enden freilich nicht etwa in den Mittellamellen, sondern sind zuletzt gegen die Lumina der durch die antiklinalen Wände getrennten Protoplasten gerichtet (vgl. Abb. 10 und 21). In manchen Aufsichten entsteht der Eindruck, als ob die Ektodesmen die Täler der Cuticularriffelung bevorzugen und die Riffelberge vermeiden (vgl. SCHNEPF 1959, S. 651). Dann folgen die Ektodesmenketten dem Verlaufe der Riffelungsmuster. Besonders regelmäßig scheinen solche Ketten über den Antiklinen der parallelverlaufenden langgestreckten Epidermiszellen unter den größeren Nerven ausgebildet zu sein. Ähnliche Ketten, nun aber ringförmig, sind gleichsam

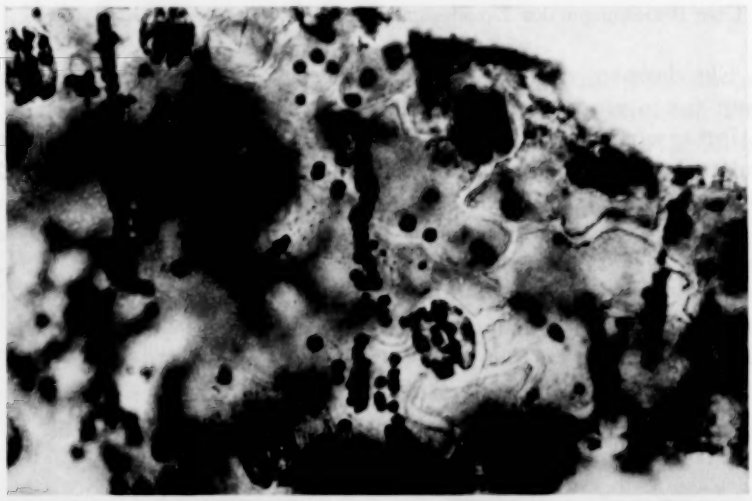


Abb. 24

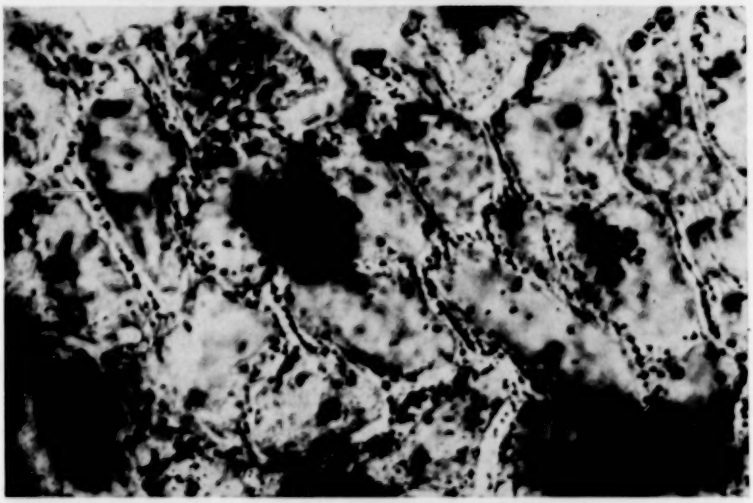


Abb. 25

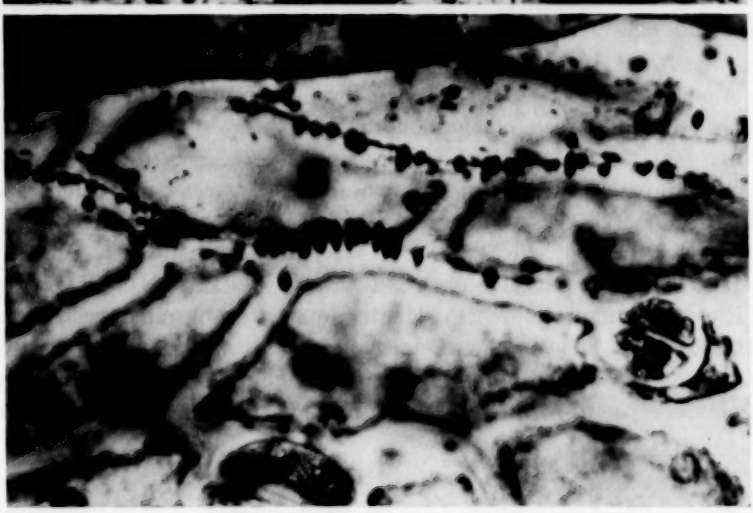


Abb. 26

Abb. 24—26 (Legenden S. 405)

in Fortsetzung der an den Haarbasiszellen in Schraubenlinien vorkommenden Ektodesmen (Abb. 15) auch in den Fußzellenaußenwänden der Kegelhaare anzutreffen (Abb. 22).

Auf Grund der in Aufsichten wahrnehmbaren Verteilung der Ektodesmen wird es verständlich, daß bei Querschnittspräparaten je nach der Schnittrichtung, d. h. parallel oder senkrecht zum Verlauf solcher Ketten lokal eine Häufung oder stellenweises Fehlen von Ektodesmen festzustellen ist. Es erhellt daraus, daß für das Studium der Verteilung und des quantitativen Vorkommens von Ektodesmen unbedingt Aufsichtspräparate zu untersuchen sind.

4. Beobachtungen im Zusammenhang mit einer Stoffaufnahme durch Blätter

Wir bemerkten eingangs schon, daß in den Außenwänden unbehandelter frisch geschnittener Epidermiszellen keine Ektodesmen oder ähnliche Gebilde zu erkennen sind. Erst nach einer Fixierung mit dem Gilsongemisch und nach Färbung mit Pyoktanin werden sie sichtbar.

Allerdings haben schon Schumacher (1942) und Schnepf (1959) angegeben, daß auch ohne die Färbung gröbere Umrisse von Strukturen deutlich werden. Bei der Sublimatmethode werden bekanntlich fixierte Blattstücke zur Entfernung überschüssigen Sublimats in Alkohol gewaschen, danach geschnitten und die Schnitte dann in Jodkalium getaucht und schließlich mit Pyoktanin gefärbt. Die Färbung verdeutlicht also nur die durch das Fixierungsgemisch bzw. deren chemische Reaktionen oder physikalische Veränderungen lichtabsorptionsfähig gewordenen Strukturteile der Zellwand. Diese erfahren dabei eine Vergröberung, die das Sichtbarwerden erst ermöglicht.

Fragen wir uns nun, auf welchem Wege die Fixierlösung beim Eintauchen der Blattstücke in die Gewebe eindringt, so gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten:

1. Die Lösung dringt durch die Spaltöffnungen ein.
2. Sie permeiert durch die Wundränder.
3. Das Fixiergemisch wandert durch die Cuticula der Blattoberfläche in die Zellwand.

Das Eindringen durch die Spaltöffnungen ist infolge der Gasfüllung der Atemhöhlen und der Intercellularen erschwert. Immerhin ist im verletzten Zustand die Verdrängung der Gase aus diesen Räumen möglich, und die Lösung könnte dann diese Hohlräume erfüllen. Dafür sprechen Beobachtungen an größeren Blattstücken, die nur mit gesättigter Sublimatlösung nach A/5 fixiert, aber nicht gefärbt wurden.

Abb. 24. Ektodesmenketten ohne Beziehung zu Zellgrenzen (Aufsicht, Sublimatmethode, 640mal)

Abb. 25. Ektodesmen über den Antiklinen (Aufsicht, Sublimatmethode, 256mal)

Abb. 26. Aufsicht von schräg oben auf Ektodesmen über den Antiklinen der Epidermiszellen eines Blattnerves (Sublimatmethode, 640mal)

Bei mehreren Stomata war dann offensichtlich durch die Spalten Substanz eingedrungen und hatte sich auskristallisierend zopfartig zusammengeballt (Abb. 21). Bei Anwendung der normalen Sublimatmethode (A/1) durchdringt das Fixiergemisch hin und wieder die Spalten und schlägt sich in den Atemhöhlen zu grünlich-gelben Pföpfen nahe dem Porus nieder.

Diese Art des Eindringens von Lösungen in das Blattinnere ist infolge der Gasfüllung der Atemhöhlen in unverletzten Blättern in vivo sicher nicht möglich (FRANKE 1957) und ist bei Blattstücken nur auf

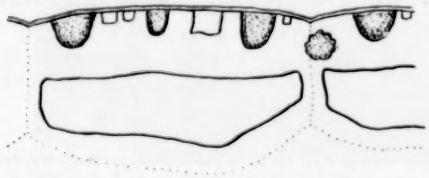


Abb. 27

Abb. 28

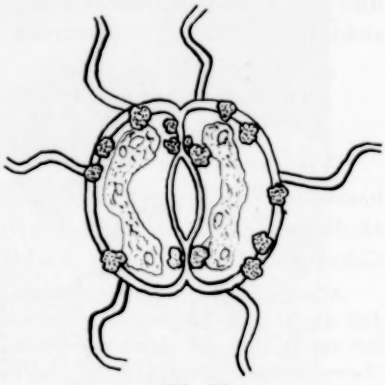


Abb. 29

Abb. 27. Bildungen in der Zellwand nach Sublimatfixierung A/2 ohne Pyoktaninanfärbung (Querschnitt durch obere Epidermis)

Abb. 28. Kristalle und Kristallhäufchen in der Zellwand unter einem Nerven nach Sublimatfixierung A/2 ohne Pyoktaninfärbung (Querschnitt durch untere Epidermis)

Abb. 29. Schließzellenpaar mit kristallinen Strukturen an den Polen des Spaltes und an den Rückwänden nach Fixierung A/4 und A/5, ohne Anfärbung mit Pyoktanin (Aufsicht)

den Bereich der Atemhöhlen begrenzt. Eher wäre das Eintreten durch die Wundränder und eine nachfolgende Durchdringung der Gewebe von innen her zu erwarten.

Hierzu haben sich SCHUMACHER (1942) und SCHNEPF (1959) bereits eingehend geäußert. Danach ist das Eindringen im wesentlichen auf die Wundränder selbst beschränkt. SCHUMACHER kam vielmehr zu der auch von mir zu bestätigenden Ansicht, daß das Fixierungsmittel langsam von der Außenfläche her die Cuticula und die Zellwände durchsetzen dürfte und nicht von den verletzten Zellen her. SCHNEPF fordert daher (S. 654), für den Nachweis der Ektodesmen nicht Randpartien des Blattstückes, sondern die inneren Teile zu verwenden.

Für eine gute Darstellung ist also der Weg durch die Cuticula erforderlich. Um das zu prüfen, wurden Versuche angestellt, in denen nicht das übliche Verfahren nach A/1 angewendet wurde, sondern nur einzelne Komponenten des Gilsongemisches angeboten und die Nachbehandlung mit Alkohol, Jodkalium und Pyoktanin unterlassen wurde. Dabei sollten nicht Ektodesmen nachgewiesen werden, sondern das Eindringen der Substanzen verfolgt werden.

Führt man eine Fixierung nach A/2 durch, so findet man in den Außenwänden der Epidermis zahlreiche halbkugelige bis kegelförmige Gebilde, die der Cuticula ansitzen, farblos sind oder bläulich schimmern. Sie ähneln nach ihrer Lage und oft auch nach ihrer Form den Ektodesmen. Zwischen ihnen sind grünlich opalisierende, fast würfelförmige Körper zu beobachten (Abb. 27), die aber in normal nach A/1 gewonnenen Ektodesmenpräparaten ebenfalls auftreten und dann zu den

Abb. 30

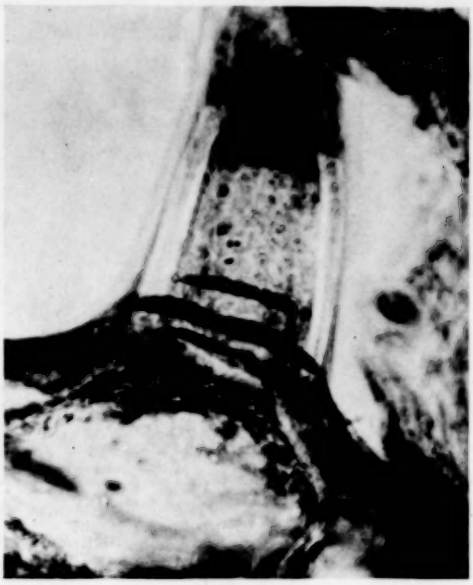


Abb. 31

Abb. 30. Kegelhaar mit Kristallen in der Basis- und Fußzellenwand an Stellen, an denen sonst Ektodesmen nachweisbar sind (Gilsonfixierung A/3, Blattquerschnitt, ohne Pyoktaninfärbung, 256mal)

Abb. 31. Kegelhaar mit Silberniederschlägen in Form von Bändern ähnlich den Ektodesmenreihen (Blattquerschnitt, Silbermethode C/4, 640mal)

violett gefärbten Ektodesmen kontrastieren. Was sie darstellen, ist noch nicht bekannt. Auffälliger sind körnige Stäbchen, unzweifelhaft kristalliner Struktur, und ganze Einkristalle in der Außenzellwand (Abb. 28). Sie entspringen ebenso wie die Ektodesmen an der Cuticula und erstrecken sich gegen das Zellumen. Zuweilen entstehen aus kristallinen Partikeln zusammengesetzte Kegel, die oft bis ans Lumen der Epidermiszellen reichen. Auch können die langgestreckten Kristalle ähnlich den Ektodesmen infolge der Zellwandquellung zerstückelt sein oder seitliche Anhängsel aufweisen (Abb. 28), wie sie in Abb. 3 für Ektodesmen dargestellt sind. Dabei kristallisieren die Äste zwischen den durch Quellung auseinanderweichenden Zellwandschichten aus. Solche Gebilde entstehen bei Anwendung der Methoden A/2 und A/3.

Betrachten wir auch hier wieder Aufsichtsbilder, so überraschen Übereinstimmungen mit der Ektodesmenverteilung. Denn die oben erwähnten halbkugeligen oder kegelförmigen Gebilde, die jetzt als rundliche Ballen erscheinen, besitzen z. B. in den Epidermen unter den größeren Nerven die gleiche Kettenanordnung über den Antiklinen, wie sie an dieser Stelle meist für Ektodesmen zutrifft. Wir hatten beschrieben, daß die Ektodesmen in den Schließzellen oftmals um die Spalten herum lokalisiert sind. Behandelt man ein Blatt nach A/4 oder A/5, also ohne Anfärbung mit Pyoktanin, so erscheinen vielfach die runden, gekerbten Ballen an den Polen und entlang den Cuticularleisten der Spalten oder sind über den Schließzellenrückwänden zu einem Ring angeordnet (Abb. 29) entsprechend den Beobachtungen der Ektodesmenverteilung (vgl. Abb. 19).

Abb. 32. Köpfchenhaar, Epidermis und Palisadengewebe durch Silbermethode C/3 schwarz gefärbt (Blattquerschnitt, 256mal)

Besonders auffallend sind ähnliche Kristallbildungen oder Substanzanreicherungen an Kegelhaaren. Wir hatten schon darauf hingewiesen, daß bei Anwendung der normalen Darstellungsmethode nach A/1 die Ektodesmen an der Haarbasiszelle und in der Fußzelle oft zu Ketten gereiht sind. Führt man die Fixierung nach A/3 oder A/4 durch, so sind an den den Ektodesmen entsprechenden Orten in gleicher Ordnung grünlich schimmernde Körper zu beobachten (Abb. 30). Wurden mit Ascorbinsäure gefütterte Blätter mit HNO_3 fixiert und dann mit ammoniakalischer Silbersalzlösung nach C/4 behandelt, so traten an den Basiszellen der Haare schwarze Bänder auf, die offenbar aus ineinanderfließenden Punkten gebildet sind und auch nach Aufhellung der Schnitte mit NaCN erhalten blieben (Abb. 31). Die Orte ihres Vorkommens decken sich mit denen der dort sonst in Reihen nachweisbaren Ektodesmen.

Endlich seien noch die Köpfchenhaare erwähnt. Wir hatten schon angeführt, daß die die Fußzelle umgebenden Epidermiszellen stets durch eine größere Zahl von Ektodesmen ausgezeichnet sind. Behandelt man Blätter nach A/5, so entstehen in den Lumina dieser Zellen ähnlich wie in den Atemhöhlen der Stomata grünlich schimmernde ballige Massen (Abb. 18), die den übrigen Epidermiszellen fehlen. Offenbar vermag

hier die Fixierlösung in besonders reichem Maße einzudringen und wird konzentriert. Wird die Methode C/3 angewendet, so sind die Köpfchen der Haare trotz starker Aufhellung mit NaCN stets tiefschwarz gefärbt. Aber auch die tiefer liegenden Gewebe bleiben schwärzlich, wie wenn an diesen Orten das Eindringen der Substanzen von besonderer Intensität ist (Abb. 32). Dank dieser schwarzen Partien kann man in Querschnittsbildern und Aufsichten die Köpfchenhaare sofort lokalisieren.

Die in diesem Abschnitt vorgetragenen Beobachtungen lassen zwei Folgerungen zu:

1. Die angebotenen Lösungen dringen in der Regel von der Blattoberfläche her durch die Cuticula ein und wandern durch die Zellwand gegen die Protoplasten zu. Eine Stoffaufnahme ist sichtbar erfolgt.

2. Die dabei durch Kristallisation, Adsorption oder Ballung aus der eingedrungenen Substanz entstehenden Gebilde stimmen nach ihrer Lage mit den Orten überein, an denen sich bei Anwendung des Sublimatverfahrens (A/1) Ektodesmen nachweisen lassen.

III. Diskussion

Während im frischen, unbehandelten Blatt keinerlei an die Ektodesmen erinnernde Strukturen in den Zellwänden wahrzunehmen sind, treten nach Behandlung mit den verschiedenen Methoden Bildungen zutage, die wegen ihrer Ähnlichkeit mit den schon länger bekannten Plasmodesmen in den Innenzellwänden als Außenwandplasmodesmen bezeichnet worden sind. Da sie mit den zur Plasmodesmendarstellung üblichen Verfahren nicht nachgewiesen werden können, sondern eigener Darstellungsmethoden bedürfen und insbesondere durch die Eigenschaft, an die Außenwelt anzugrenzen, eine Sonderstellung einnehmen, ist für sie der Terminus „Ektodesmen" vorgeschlagen worden (Ruhland). Die Eigentümlichkeit, nur mit besonderen Verfahren darstellbar zu sein, kann freilich nicht als spezifisch gelten, da eindeutig entsprechende Strukturen auch in Innenzellwänden sichtbar gemacht werden konnten. Es ist jedoch bemerkenswert, daß solche Innenwandplasmodesmen stets nur nahe der Epidermis nachgewiesen werden, wie wenn ein Gefälle in der Potenz zur Reaktion auf das Nachweisgemisch bestünde, das von der Oberfläche ausgeht.

Wenn es richtig ist — woran ich nicht zweifle —, daß die im einzelnen noch unbekannten Reaktionen beim Nachweis der Ektodesmen einen Reduktionsschritt einschließen, wobei der reduzierende Körper in der Zellwand vorgegeben sein muß, während der reduzierbare eingeführt wird, so ist jedenfalls gewiß, daß dieser reduzierende Körper in der Zellwand nicht diffus, sondern in bestimmten lokalisierten Bahnen angeordnet ist. Es liegt nahe, anzunehmen, daß das Reduktionsvermögen plasmagebunden ist und daß daher die Ektodesmen ebenso wie die

Plasmodesmen plasmatischer Natur sind. Den Beweis dafür haben SCHUMACHER (1957), SCHNEPF (1959) und SIEVERS (1959) erbracht.

Eigenart und Umfang der durch das Nachweisverfahren sichtbar gemachten Strukturen müssen freilich nicht durch das Plasma bedingt sein. Vielmehr ist der durch die Methoden bewirkte Niederschlag dazu geeigneter Substanzen sicher unterschiedlich. Damit könnte verständlich werden, daß beim Jod-Silber-Verfahren nach SCHNEPF ebenso wie beim Nachweis mit ammoniakalischer Silbersalzlösung verhältnismäßig feine Strukturen, beim Sublimatverfahren aber gröbere Umrisse erkennbar werden.

Es ist jedoch auffallend, daß etwa im Gegensatz zu Primelblättern mit der gleichen Sublimatmethode trotz des Zusatzes von Oxalsäure, die die Strukturen doch verfeinern soll (LAMBERTZ 1954), in der überwiegenden Zahl der untersuchten Präparate die Ektodesmen von *Plantago major* grob keilförmig erscheinen. Auch bei stärkster Vergrößerung konnte ich keine weiteren Strukturfeinheiten erkennen, ausgenommen, daß zuweilen bei Abbauformen ein dunkler gefärbter Zentralstrang sichtbar wird (Abb. 2). Vergleicht man damit die mit der Jod-Silber-Methode dargestellten Ektodesmen, so ist bemerkenswert, daß dort die feinen Fäden vielfach dicht gebüschelt sind und je eine solche halbkugelförmige Gruppe den etwa zwei- bis dreifachen Umfang eines nach dem Sublimatverfahren dargestellten Ektodesmos einnimmt. Man könnte daher versucht sein, auch in den grobkeiligen Ektodesmen einen Komplex von mehreren zusammengefaßten feinen Fäden anzunehmen. Doch ist keine Handhabe zur Stützung dieser Vorstellung zu finden. In Aufsichtsbildern gewinnt man hin und wieder den Eindruck, als seien 2 oder 3 Röhrchen oder Fäden miteinander vereinigt. Bei der Mehrzahl der Strukturen ist das jedoch nicht zu beobachten.

Es sei aber in diesem Zusammenhang an die elektronenoptischen Aufnahmen von SCHNEPF (1959) erinnert. Aus dessen Bildern wird deutlich, daß mehrere feine Fibrillen ein Bündel bilden, das offenbar einem Ektodesmos beim Sublimatverfahren entspricht. Werden mit der Jod-Silber-Methode dargestellte Ektodesmen elektronenoptisch untersucht, so sind derartige Fibrillenbüschel nicht erkennbar. Es ließe sich also vorstellen, daß die grobkeilförmigen Ektodesmen beim Sublimatverfahren Gruppen von mehreren Einzelektodesmen sind, die den mit dem Jod-Silber-Verfahren nachgewiesenen Gruppen entsprächen.

Ebenfalls ist nicht mit Sicherheit zu erklären, warum die Ektodesmen vielfach nicht die ganze Wand bis zum Lumen durchsetzen, sondern an der Cuticula anhaftend nur zum Teil nachweisbar sind. Wie SCHUMACHER (1957) ausführlich dargestellt hat, besteht kein Grund zu der Annahme, daß die Ektodesmen Pseudopodien gleich vom Protoplasten ausgestreckt oder eingezogen werden. Vielmehr dürfte die Teilanfärbung vielleicht auf einer „Aktivitätsveränderung" des Plasmas längs der Ektodesmen beruhen, etwa auf einer Veränderung des Reduktionsvermögens (SIEVERS 1959), die bewirkt, daß in einem Falle der ganze Ektodesmos bis zum Lumen hin, in anderen Fällen nur der

cuticulanahe Teil sichtbar wird. Das bedeutet also, daß die Plasmafäden ständig in der Wand vorhanden sind und nur ihre Darstellungsfähigkeit von einem wechselnden Bedingungsgefüge abhängt. Gelegentlich ist zu erkennen, daß die Ektodesmen an der Cuticula tiefdunkel ausgefärbt sind, gegen das Lumen zu aber heller werden und immer schwächere Konturen zeigen (Abb. 2, oben rechts).

Vielleicht ist hierbei der gleiche Gradient wirksam, der unter gegebenen Umständen auch Innenplasmodesmen mit dem Sublimatverfahren deutlich werden läßt. Denn wenn die Plasmodesmen mit dem gleichen Verfahren dargestellt werden, so sind die Ektodesmen stets tiefdunkel gefärbt.

In manchen Fällen freilich mögen solche verkürzte Ektodesmen auf Zerreißungen der submikroskopisch feinen kontinuierlichen Plasmafäden infolge der starken Wandquellung beruhen. Vielleicht bedingen chemische und physikalische Gegebenheiten an der Grenze zwischen Cuticula und Plasmafaden eine festere Bindung, so daß die Ektodesmen im allgemeinen an der Cuticula so fest anhaften, daß bei wachsendem Quellungsdruck die Plasmafäden eher am Lumen abreißen als an der Cuticula. Ja, man könnte sogar spekulieren, daß lokal eine Verflechtung der Cuticularsubstanz mit dem Ektodesmenplasma besteht, die vielleicht die Durchdringbarkeit der Cuticula über dem Ektodesmos verständlich machen könnte. Andere Verhältnisse liegen dagegen sicher bei den sog. Abbauformen vor, die dem Lumen ansitzen und die Cuticula nicht erreichen (vgl. SCHUMACHER 1957).

Fragen wir uns nun, auf welchem Wege die Stoffe, die die Sichtbarmachung der Ektodesmen bewirken, in oder an die Ektodesmen gelangen, so haben wir die beiden Möglichkeiten des Eindringens durch die Spaltöffnungen oder durch die Wundränder bereits ausgeschlossen bzw. abgegrenzt. Für den letzteren Fall wäre insbesondere zu erwarten, daß dann auch Innenwandplasmodesmen, die ja nachweislich durch die Sublimatmethode dargestellt werden können, in größerer Zahl auftreten (vgl. SCHNEPF 1959). Das ist aber nicht der Fall. Vielmehr sind solche nur nahe der Oberfläche in den Innenwänden der Epidermiszellen oder in den subepidermalen Zellschichten zu finden. Nur in den Gebieten der Wundränder selbst trifft das Eindringen der Fixierlösungen von der Seite her zu (SCHNEPF 1959, S. 654), während in den von den Wundrändern entfernten Blatteilen das Eindringen der Fixierungsgemische durch die Cuticula anzunehmen ist.

Dafür sprechen auch meine Versuche, in denen ich nicht das vollständige Gilsongemisch, sondern nur Komponenten davon auf die Blattstücke einwirken ließ. Wie oben beschrieben wurde, ergaben sich im Verlaufe dieser Einwirkungen Kristallbildungen und Intrusionen, die offensichtlich auf lokalisierte Bezirke beschränkt sind. Diese Orte stimmen aber ihrer Lokalisation nach mit denen überein, an denen auch

Ektodesmen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15 mit 30 und 31 sowie Abb. 19 mit 29). Die stäbchenförmigen Intrusionen gehen stets von der Cuticula und nicht etwa vom Lumen aus. Natürlich besteht kein Zweifel daran, daß es sich bei diesen Gebilden um Kristalle oder Substanzablagerungen handelt, die letztlich aus der auf das Blatt gebrachten Lösung herrühren und damit eine Stoffaufnahme sichtbar beweisen. Diese Bildungen sind um die Ektodesmen herum oder in sie hineingelagert.

Ist damit gesichert, daß die Einwanderung der Stoffe durch die Cuticula in die Zellwand hinein erfolgt, so ergibt sich nun die Frage, ob die Lösungen diffus in breiter Front oder lokalisiert in Bahnen, also etwa durch die Ektodesmen selbst, ins Blatt einwandern. Wir berühren damit zugleich die dieser Arbeit zugrunde liegende Frage nach den Wegen, auf denen sich die Stoffaufnahme bzw. Stoffabgabe durch die Blätter allgemein vollzieht, sei es die Aufsaugung von Regenwasser und Tau, die Aufnahme von Nährsalzen bei Blattdüngung oder die Abgabe von Transpirationswasser und darin gelösten Salzen. Beide Vorgänge sind bewiesen (BOYNTON 1954, FRANKE 1957, WITTWER u. TEUBNER 1959, ARENS 1934, TUKEY, TUKEY u. WITTWER 1958).

Eine noch nicht erklärbare Schwierigkeit bietet die ausgesprochen hydrophobe Cuticula bei der Aufnahme wäßriger Lösungen. Denn in allen bisher veröffentlichten Untersuchungen der Cuticula konnten keine Durchbrechungen, Poren oder dergleichen festgestellt werden. Die Cuticeln waren homogen und wiesen bestenfalls Dünnstellen oder Gruben auf. Andererseits muß es als sicher gelten, daß die Ektodesmen nach außen hin stets von der Cuticula überdeckt werden. Dennoch passieren die Stoffe dieses dank seiner lipoiden Eigenschaften für wäßrige Lösungen so schwierige Hindernis. Damit müssen wir uns vorläufig bis zu einer Klärung abfinden.

Im Zusammenhang mit der cuticulären Transpiration ist die Auffassung entwickelt worden, die Cuticula sei in Wasser quellbar und ihr könne deshalb durch Transpiration Wasser entzogen werden (vgl. STÅLFELT 1956). Das besagt, daß zumindest Wassermoleküle die Cuticula zu durchdringen vermögen. Ob die daraus anzunehmenden Poren aber stets so groß sind, daß auch größere Moleküle, sei es durch Lösungsvorgänge oder durch freie Diffusion, die Cuticula passieren können, ist eine noch nicht geklärte Frage. Doch ist die Vorstellung dazu notwendig (vgl. SCHIEFERSTEIN u. LOOMIS 1959).

Abgesehen von dieser Barriere der Cuticula, die ja prinzipiell für beide Durchdringungsmodi gilt, ob diffus oder in lokalisierten Bahnen, soll nun geprüft werden, ob die Ektodesmen als Transportbahnen für den Stoffaustausch durch die Zellwand in Frage kommen oder nicht. Vergegenwärtigen wir uns die einzelnen Vorgänge beim Nachweis von Ektodesmen, so ist folgendes festzustellen. Zunächst dringt das fixierende Gilsongemisch ins Blatt ein. Ohne Zweifel entstehen wohl infolge

chemischer Reaktionen, Adsorption und Konzentrierung der eingedrungenen Substanzen in und an den Ektodesmen körnige Niederschläge oder Kristalle, die als solche schon Lage und Form der Ektodesmen grob verdeutlichen. Ein Teil des Quecksilber-II-Chlorides mag dabei durch die dem Plasma innewohnende Reduktionskraft zu Quecksilber-I-Chlorid reduziert werden. Ein anderer Teil des Sublimats kristallisiert aus. Unter dem Mikroskop sind diese groben Strukturen in Blattquerschnitten zu erkennen. Werden die Blattstücke aber zuvor in Alkohol gewaschen und die Schnitte in Jodkalium gebadet, so kommt es zur Auflösung der körnigen Niederschläge und der Kristalle, und erst die nachfolgende Anfärbung mit Pyoktanin macht die jetzt etwa feineren Strukturen der Ektodesmen wieder gut sichtbar (vgl. SCHUMACHER 1942).

Für unsere Frage ist nun der genaue Vorgang des Eindringens von Interesse. Gesetzt den Fall, die Lösungen würden durch die Ektodesmen in die Zellwand eintreten, so könnten sich im Plasma dieser Strukturen Niederschläge bilden oder Adsorptionen erfolgen, wobei die Ektodesmen infolge der Quellungswirkung der Lösungen in ihren Ausmaßen vergröbert werden. Es könnten sich auch kleine Kristalle bilden.

Andererseits gibt die Entstehung der gar nicht so seltenen großen Kristalle innerhalb der Zellwand zu denken. Kristalle wachsen ja nicht von innen heraus, sondern von außen her durch Apposition. Das würde aber erfordern, daß die kristallisierende Substanz ebenfalls von außen, d. h. von außerhalb des Ektodesmos herandringt und daß mithin ein diffuses Eindringen der Lösungen durch die Cuticula, also nicht nur in bestimmten Bahnen, die den Ektodesmen entsprechen, geradezu Voraussetzung ist. Die Ektodesmen wären dann lediglich Kristallisationskerne, und es wäre daher nicht verwunderlich, daß solche Substanzablagerungen bevorzugt an den Orten entstehen, an denen Ektodesmen regelmäßig nachweisbar sind. Nach dieser Vorstellung würden die Fixierlösungen mit ihren quellungsfördernden Komponenten diffus über die gesamte Blattoberfläche unabhängig von den Ektodesmen einwandern und in das Capillarensystem der Zellwände gelangen. Sie würden sich an und um die Ektodesmen niederschlagen oder kristallisieren können, wobei nur in den Plasmafäden selbst eine Reduktion stattfände, soweit das Vermögen dazu gegeben ist. Nach Weglösen des überschüssigen teils auskristallisierten Sublimats kämen dann endlich die Ektodesmen zum Vorschein. Für Wasser und Farbstoffe hat STRUGGER (1938a) eine solche Wanderung durch das submikroskopische Capillarensystem der Zellwand angegeben.

Demgegenüber könnte man aber auch die Vorstellung entwickeln, daß dennoch ein Eindringen durch die Ektodesmen zumindest vorwiegend erfolgt. Die zunächst durch die Ektodesmen von außen eindringenden Lösungen könnten nämlich aus diesen heraus in die mit

Wasser imbibierten Zellwandschichten eintreten und dort eine Quellung auslösen, die nun wieder einen Wasserentzug aus den nachlieferungsfähigen Ektodesmen zur Folge hat. Dadurch käme es einerseits zu einer Konzentrierung an gelösten Bestandteilen innerhalb der Ektodesmen selbst, andererseits könnten mit dem entzogenen Quellungswasser auch solche gelösten Teile wenigstens eine kurze Strecke aus den Ektodesmen herauswandern und sich dann unter Kristallisation auf ihnen von außen auflagern. Nach dieser Vorstellung würde also die Aufnahme von der Blattoberfläche her lokalisiert durch die Ektodesmen erfolgen und die Bildung von Kristallen um diese Aufnahmebahnen herum verständlich werden.

Der Theorie nach wären beide Wege, des auf die Ektodesmen begrenzten lokalisierten und des über die ganze Zellwand verteilten diffusen Eindringens möglich. Im Falle der diffusen Einwanderung sollte die Quellung der Zellwand der Niederschlagsbildung um die Plasmafäden herum und damit der Reduktion des Quecksilbers im Plasma der Ektodesmen vorausgehen oder doch zeitlich mit ihr zugleich erfolgen. Im Falle der Aufnahme durch die Ektodesmen jedoch wäre ein Nachhinken der Quellung gegenüber der Reduktion des Quecksilbers zu erwarten, da die quellungsfördernden Substanzen erst die Ektodesmen passieren müßten, ehe sie ihre Wirkung in den Membranen entfalten könnten. Die Entscheidung zu dieser Alternative kann das Sublimatverfahren nach A/1 liefern. Denn durch Anfärbung mit Pyoktanin werden ja die Plasmateile sichtbar gemacht, in denen eine Reduktion stattgefunden hat. Wird nämlich, wie SCHNEPF (1959) beobachtet hat und wie ich durch eigene Untersuchungen bestätigen kann, die sonst auf 10—12 Std bemessene Fixierungsdauer auf 10 min beschränkt, so erfolgt zwar die Sublimatreduktion in den Plasmafäden, die Quellung aber unterbleibt. Der Eintritt der Fixierlösung in die Ektodesmen vollzieht sich demnach zeitlich vor der Ausbreitung der quellungsfördernden Substanzen in die Membranen der Außenwände. Daraus folgt, daß die angebotene Lösung zuerst durch die Ektodesmen eindringt und daß diese also die Aufnahmebahnen darstellen.

Man könnte freilich einwenden, daß die Quellung ein langsamerer Vorgang sei, bei dem die ganze Außenwand von den Fixiersubstanzen durchdrungen werden könnte, ehe die Quellung als solche sichtbar würde. Die rascher verlaufende Reduktion entlang den Ektodesmen wäre dann auch bei diffusem Eindringen verständlich. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß zum einen die Reduktion nach 10 min durchgehend entlang den Ektodesmen, die hierbei als sehr feine Fäden in Erscheinung treten, erfolgt ist. Zum anderen aber sollte dann die Kristallisation ebenso am Lumen, also an der Plasmagrenzschicht des Protoplasten, stattfinden können. Die Kristallstäbchen und -kegel

sitzen jedoch stets der Cuticula und nicht dem Lumen an, und die breiteste Stelle der Kegel ist stets der Oberfläche zugekehrt. Die Vorstellung der Ektodesmen als Transportbahnen bei der Stoffaufnahme wird damit aber bestätigt.

Nun gibt es noch eine Reihe weiterer Beobachtungen, die unter Berücksichtigung der anfangs beschriebenen Ektodesmenverteilung im Blatt für die Annahme einer Transportbahnfunktion der Ektodesmen sprechen. Darüber soll im folgenden berichtet werden.

a) Die Epidermis über und unter den Nerven. Bei der Sichtung der mikroskopischen Befunde war aufgefallen, daß in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Stellen, wo Ektodesmen regelmäßig nachgewiesen werden können, häufig mit der gleichen Methode auch Innenplasmodesmen dargestellt werden (vgl. SCHUMACHER 1942, Fig. 5; LAMBERTZ 1954, S. 171, Abb. 18—20). Integrierend lassen sich so Bahnensysteme aufzeigen, über die von der Cuticula her eindringende Substanzen von Zelle zu Zelle wandern könnten (Abb. 5 und 10). Das gilt insbesondere für die Bereiche unter den größeren Nerven, aber auch die Epidermen beiderseits und über den Nerven sind auffallend reich an Ektodesmen. Diese Gewebe nun werden von ZAMFIRESCU (1931) als besonders wegsam für Lösungen beschrieben. RUDOLPH (1925) bestätigt für die Gewebe über den Nerven bei mehreren Pflanzen die von GARREAU (1849) beobachtete besondere Durchlässigkeit für Transpirationswasser und führt die Begünstigung der cuticulären Transpiration an dieser Stelle auf die kollenchymatisch stark verdickten Zellwände zurück. Sie sollen als Wasserspeicher die Cuticula durchtränken und so eine höhere Transpiration ermöglichen. Auch KRAUSE (1935) konnte für die Epidermen über den Nerven vielfach eine gute Durchlässigkeit für Neutralrotlösung feststellen. Daß gerade an diesen Geweben in der Epidermis wenigstens bei den bisher von LAMBERTZ, SCHNEPF, SIEVERS und mir untersuchten Pflanzen die Ektodesmen gehäuft anzutreffen sind, scheint doch eine Beziehung der Ektodesmen zur Stoffaufnahme zu bestätigen.

b) Kegelhaare. Ähnliches gilt von den Kegelhaaren und ihrem Ektodesmenreichtum (Abb. 10, 13—15, 22 und 23). Man gewinnt den Eindruck, als würden die Fixierlösungen in die Haare sowie die umliegenden Epidermiszellen verstärkt eindringen und die reduzierbare Komponente des Gemisches stärker reduziert, so daß die Ektodesmen und Plasmodesmen dunkler gefärbt erscheinen als an benachbarten Stellen. Wiederholt ist aber für Haare verschiedener Pflanzen angegeben worden, daß gelöste Farbstoffe besonders leicht in sie eindringen (FRENZEL 1929, KRAUSE 1935, STRUGGER 1938b, 1939, 1940. STEUBING 1949). Auch BODE (1958) hält es auf Grund seiner Versuche mit Methylenblau für möglich, daß die Stoffaufnahme von Tomatenblättern durch deren kleine Drüsenhaare bevorzugt erfolgt. Nach STEUBING (1949) sollen die locker

stehenden Haare von einigen Strandpflanzen der Ostsee als Taufänger, also für die Wasseraufnahme, eine Rolle spielen, wie sie mit Berberinsulfat zeigen konnte. Sie führt dafür unter anderem *Plantago lanceolata* und *P. maritima* an. KRAUSE (1935) schildert eine Reihe von Beobachtungen, nach denen in einigen Pflanzen die Haare, zumindest ihre Basalzellen, und die sie umgebenden Epidermiszellen sich leicht mit Neutralrot färbten, und bringt diese Befunde in Zusammenhang mit einer bevorzugten Wasseraufnahme oberirdischer Pflanzenorgane. STRUGGER (1939) hebt die Bedeutung der Haare in seinen Versuchen über die Aufnahme von Berberinsulfatlösungen über die Blattoberfläche bei inversem Transpirationsstrom besonders hervor und äußert: „Ich möchte schon jetzt die Hypothese aussprechen, daß die lebenden oberirdischen Pflanzenhaare auch der Stoffaufnahme dienen können." Wieweit dieser Ausspruch in bezug auf die Ektodesmen gerade bei dem von ihm verwandten Objekt *Helxine soleirolii* Gültigkeit besitzt, soll in einer folgenden Mitteilung untersucht werden. Richtig ist jedenfalls, daß manche Haare, so hier bei *Plantago major* und bei *Primula acaulis* (LAMBERTZ 1954, S. 164), durch ausgesprochenen Reichtum an Ektodesmen gekennzeichnet sind.

c) Köpfchenhaare. In den Epidermiszellen um die Köpfchenhaare herum sind die Ektodesmen zahlenmäßig auffällig gehäuft (Abb. 17), wenn auch in den Haaren selbst keine Ektodesmen zu finden sind. Bei einer Benetzung der Blattflächen wird sich gerade in den Winkeln unter dem Köpfchen Wasser oder eine Lösung längere Zeit halten und weniger rasch verdunsten. Auch fällt es auf, daß in meinen Präparaten an *Plantago* in den Innenwänden der Epidermiszellen Büschel von krallenartigen, meist dunkelbraun erscheinenden Strukturen die Wände durchsetzen (Abb. 16). In Aufsichtspräparaten werden durch diese dunklen Strukturen sogleich die Stellen erkennbar, wo solche Köpfchenhaare ausgebildet sind. Es ist bemerkenswert, daß die die Fußzelle umgebenden Epidermiszellen strahlenförmig auf die Fußzelle zu gerichtet sind und selbst die darunterliegenden Schwammparenchymzellen traubenartig an der Fußzelle ansitzen, als bildeten sie einen besonders engen Verband. Ob die krallenartigen Gebilde Plasmodesmen sind, konnte ich bisher nicht eindeutig ermitteln. Doch gewinnt man unmittelbar den Eindruck, als ob die Haare Sammler für Wasser oder Lösungen seien und die Ektodesmen der umgebenden Zellen in deutlicher Beziehung zur Stoffaufnahme stünden. Damit stimmen Befunde von KRAUSE (1935) überein. Denn die Autorin konnte in einigen Fällen *(Heracleum sphondylium, Phaseolus coccineus, Salvia verticillata* und *Onosma visianii)* beobachten, daß sich zwar die die Haare kranzförmig umsäumenden Epidermiszellen mit von außen her angebotener Neutralrotlösung leicht und rasch anfärbten, nicht aber die Haare selbst. Ob die Haare dieser

Pflanzen ebenso wie die Köpfchenhaare von *Plantago major* keine Ektodesmen besitzen, die umgebenden Zellen aber reichlich mit ihnen ausgestattet sind, muß freilich noch geprüft werden.

d) Die Antiklinen. In den Aufsichtspräparaten konnte ich eindeutig darlegen, daß die Ektodesmen über den Antiklinen oder doch unmittelbar daneben sehr oft in Ketten massiert sind (Abb. 25 und 26). Für die cuticuläre Transpiration sind aber wiederholt gerade die Antiklinen als bevorzugte Orte angegeben worden (Buscalioni und Pollacci 1901, Rudolph 1925). Strugger (1938a) hat auf Grund seiner Versuche mit Fluoresceinkalium, das dem Transpirationsstrom folgend sich besonders in den Antiklinen anreicherte, eine Neuformulierung der Sachsschen Imbibitionstheorie gegeben und die Membranen dieser Antiklinen als die Endstellen der Kohäsionsfäden bezeichnet. Die reiche Massierung von Ektodesmen an diesen Orten bringt ein anderes Licht in die Frage nach den Wegen der cuticulären Transpiration. Daß letztere tatsächlich über den Antiklinen gefördert ist, wurde schon mehrfach bestätigt (vgl. Rudolph 1925). Drängt sich aber nicht die Vorstellung auf, daß die Beobachtungen der cuticulären Transpiration einerseits und der Ektodesmenmassierung an den Antiklinen andererseits in Beziehung zueinander stehen?

Im Zusammenhang mit der cuticulären Transpiration sei auf ein weiteres Phänomen hingewiesen. Rudolph (1925) hat in zahlreichen Versuchen gezeigt, daß die cuticuläre Transpiration gewelkter Blätter ohne Ausnahme wesentlich geringer ist als die turgescenter Blätter (weitere Literatur darüber bei Rudolph). Er interpretierte diese Befunde so, daß der größere Wassergehalt der Membranen bei turgescenten Blättern etwa im Sinne Renners (1915) eine bessere Durchfeuchtung der Cuticula gewährleistet und damit die cuticuläre Transpiration fördert. Beim Welken tritt aber Entquellung der Membranen ein, die Cuticula entquillt ebenfalls, und die Transpiration wird vermindert. Bemerkenswerterweise beobachtete nun Schnepf (1959) bei Versuchen mit welkenden Blättern, daß die Zahl der nachweisbaren durchgehenden Ektodesmen gegenüber turgescenten Blättern abnimmt, die Zahl der verkürzten aber ansteigt und außerdem zahlreiche Abbauformen auftreten. Schnepf hält es für möglich, daß die Befunde „auf eine gewisse Beziehung zwischen cuticulärer Transpiration, Plasmazustand und damit auch Ektodesmenzustand" hindeuten.

Wie hier bei der Wasserabgabe durch cuticuläre Transpiration habe ich umgekehrt in einigen Versuchen bei der Stoffaufnahme einen Zusammenhang mit den Ektodesmen festgestellt. In Fortführung von Versuchen über die Aufnahme von Ascorbinsäure durch Blätter von *Plantago major* mit Hilfe der Blatthälftenmethode (Franke 1957) konnte ich zunächst beobachten, daß bei turgescenten Blatthälften, die

über 6—8 Std auf einer Ascorbinsäurelösung (1×10^{-2}) schwammen, der Vitamin C-Gehalt sich gegenüber der Kontrolle bis zu 100% erhöhte. Waren aber die Blatthälften angewelkt, so fand keine oder nur eine sehr geringe Aufnahme von Ascorbinsäure statt, oder der Vitamin C-Gehalt verminderte sich sogar. In noch unveröffentlichten Versuchen, bei denen gleichzeitig die Ektodesmenanzahl nach einem Schätzungsverfahren ermittelt und die Ascorbinsäureaufnahme bestimmt wurde, war in Übereinstimmung mit den Befunden von SCHUMACHER und LAMBERTZ (1956) bei den Blättern, die nachweislich Ascorbinsäure aufgenommen hatten, auch die relative Ektodesmenanzahl eindeutig erhöht. Bei einigen angewelkten Blättern aber war die Zahl vermindert und der Vitamin C-Gehalt gegenüber der Kontrolle gleichgeblieben oder etwas abgesunken. Es ergab sich also die gleiche Erscheinung, daß beim Welken der Blätter sowohl der Ektodesmenzustand verändert als auch die Stoffaufnahme unterblieben war.

e) Schließzellen. Das regelmäßige gehäufte Vorkommen von Ektodesmen im Bereiche der Schließzellen ist beschrieben worden (Abb. 19 bis 21). STRUGGER (1938b, 1939, 1940), der mit Fluorescenzfarbstoffen den extrafasciculären Wasser- und Stofftransport untersuchte, fand erstaunlicherweise bei mehreren Objekten immer wieder sowohl bei Aufsteigen der Farbstofflösung durch den Sproß bzw. Blattstiel als auch nach Aufbringen der Lösung über die Blattoberfläche, daß noch vor dem Fluorescenzbeginn der Antiklinen zuerst und vor allem die Cuticularleisten der Spaltöffnungen aufzuleuchten begannen. Entsprechendes berichtete STEUBING (1949) von ihren Versuchen über den Taufang von Strandpflanzen mit Hilfe aufgestäubten Berberinsulfates. Dabei betont STRUGGER, daß die Aufnahme der Farbstofflösung nicht etwa über die Spalten erfolgte. Die Ansammlung des Farbstoffes in den Cuticularleisten bei durch den Sproß aufsteigendem Lösungsstrom führte er auf die cuticuläre Transpiration zurück. Nach seiner Auffassung befinden sich entlang den Cuticularleisten submikroskopische Poren in der Cuticula, durch die Wasser dampfförmig entweicht, während sich der Farbstoff anreichert.

Ferner ist bei zahlreichen Versuchen zur Stoffaufnahme durch Blätter angegeben worden, daß die Aufnahme durch die Blattunterseiten, die entweder die Schließzellen allein oder doch in größerer Zahl enthalten, größer sei als durch die Blattoberseiten (BOYNTON 1954). Für die Wasseraufnahme ist dieser Befund schon viel früher erhoben worden (WIESNER 1882). Besonders wichtig ist das für hypostomatische Blätter, bei denen das alleinige Vorkommen der Stomata auf der Blattunterseite den Gedanken nahelegte, daß die Stoffaufnahme vorwiegend durch die Spaltöffnungen erfolge. Wie aber die Untersuchungen von WETZEL (1924) lehren, dienen die Spaltöffnungen lediglich dem Gasaustausch

und können in vivo wäßrige Lösungen nicht durch sie in das Blattinnere eindringen. Ein anderes Gewicht bekommen diese Beobachtungen der bevorzugten Stoffaufnahme durch die Blattunterseiten, wenn wir bedenken, daß in und um die Schließzellen Ektodesmen in erhöhter Anzahl und großer Regelmäßigkeit nachweisbar sind. Damit würde sich jedenfalls der auffällige Befund der größeren Stoffaufnahme durch die Blattunterseiten mühelos erklären, wenn freilich auch noch einige andere physiologische Faktoren die erhöhte Stoffaufnahme durch die Blattunterseiten begünstigen (vgl. FRANKE 1957).

f) Nektarien und Drüsengewebe. Die Frage, auf welchem Wege Nektarien und Drüsen ihre Stoffe sezernieren, hat die Physiologen schon häufig beschäftigt, denn hierbei treten Stoffe aus Zellen aus und müssen die Zellwand irgendwie passieren. Ohne die schon umfangreiche Literatur hier zu berücksichtigen, sei erwähnt, daß LAMBERTZ (1954) in den Nektarien mehrerer Pflanzen Ektodesmen nachweisen konnte. Freilich müssen noch zahlreiche weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um festzustellen, ob diese Befunde allgemeine Gültigkeit besitzen. Es wäre von Interesse, zu wissen, ob die von NIEUWENHUIS-v. UEXKÜLL-GÜLDENBAD (1914) beschriebenen Kanälchen in Nektarien identisch mit Ektodesmen sind, wie auch die Frage der Ausscheidung von Wachsen auf der Cuticula von Epidermiszellen im Zusammenhang mit dem Ektodesmenvorkommen einer erneuten Bearbeitung bedarf (vgl. SCHIEFERSTEIN und LOOMIS 1959).

g) Ektodesmennachweisbarkeit und Stoffaufnahme in Abhängigkeit von der Tageszeit. Nach zahlreichen Versuchen von LAMBERTZ (1954) ist die Anzahl der mit der Sublimatmethode nachweisbaren Ektodesmen nachts allgemein wesentlich größer als am Tage. SIEVERS (1959, 1960) hat die physiologischen Zusammenhänge dieser Erscheinung mit den Faktoren Licht und Temperatur weiter analysiert. Danach fördern tiefere Temperaturen und Dunkelheit die Nachweisbarkeit, während höhere Temperaturen und Licht sie hemmen. Wenn wir auch heute annehmen, daß die Ektodesmen als solche ständig in der Wand vorhanden sind und nicht etwa pseudopodienartig zurückgezogen werden und die Nachweisbarkeit mittels der Sublimatmethode von Bedingungen abhängig ist, die wir zusammenfassend unter dem etwas vagen Begriff der Plasmaaktivität vereinen, so mag diese variierende Aktivität auch für die Intensität der Funktion der Ektodesmen verantwortlich sein. Bemerkenswerterweise konnte nämlich festgestellt werden, daß mit N^{15} markierter Harnstoff, der auf Blätter von Zuckerrohr und Tabak aufgepinselt worden war, nachts und am frühen Morgen weit stärker absorbiert wurde als tagsüber (WITTWER und TEUBNER 1959).

Fragen wir uns nun, was gegenüber den eben dargestellten Befunden, die auf einen Zusammenhang zwischen Stoffaufnahme und Ektodesmen

deutlich hinweisen, für ein diffuses Eindringen oder Austreten von Wasser und Nährsalzen durch die Epidermisaußenwand spricht, so läßt sich nur folgendes erwähnen.

SCHUMACHER u. HALBSGUTH (1939) kamen von der Vorstellung, daß der Stofftransport bei parasitären Pflanzen vom Wirt zum Parasiten durch plasmodesmenartige Bahnen erfolge, deswegen ab, weil sie in den Wänden der an die Siebröhren des Wirtsgewebes angrenzenden Hyphenzellen von schmarotzender *Cuscuta* gerade dort keine Plasmodesmen entdecken konnten, wo sie besonders erwartet werden mußten, während Ektodesmen sonst allenthalben zu beobachten waren. In unseren Beispielen summieren sich die Ektodesmen jedoch vor allem an den Organen und Geweben, bei denen eine Stoffaufnahme oder -ausscheidung auf Grund bisheriger Beobachtungen anzunehmen wäre. Wenn weiterhin Berberinsulfat bei Angebot von der Blattoberfläche her sich in den Cuticularleisten der Stomata, in den Antiklinen und auch in periklinalen Wänden der Epidermis anreichert und bei Bestrahlung mit UV-Licht aufleuchtet, so erstreckt sich in den beschriebenen Beispielen das Aufleuchten über die ganze Membran und ist nicht auf distinkte Orte beschränkt, die den Ektodesmen entsprechen.

Es ist allerdings zweifelhaft, ob mit Fluorescenzfarbstoffen und Farbstoffen allgemein überhaupt ein Nachweis von Ektodesmen möglich ist, da ja das sichtbare Aufleuchten bzw. die Anfärbung erst nach einer Anreicherung der Farbstoffe deutlich wird. Dann sind freilich die Moleküle schon über die Membranen verbreitet. Mit Fluorescenzfarbstoffen ist jedenfalls bisher ein Ektodesmennachweis nicht geglückt. Ob dies mit Anilinblau nach dem Vorgehen von CURRIER und STRUGGER (1956) möglich ist, muß sich erst erweisen.

Immerhin muß grundsätzlich die Möglichkeit offengelassen werden, daß Substanzen nicht nur durch Ektodesmen, sondern auch diffus, vielleicht zusätzlich und etwas langsamer, durch die Zellwand eindringen können. Dies gilt insbesondere für Wasser.

Wägen wir die Argumente für und wider eine Beteiligung der Ektodesmen an der Stoffaufnahme und -abgabe durch Blätter und die in dieser Arbeit geschilderten Beobachtungen an Blättern von *Plantago major* gegeneinander ab, so scheint die Waage freilich zugunsten eines lokalisierten Eindringens und Austretens von Wasser und Lösungen durch die Ektodesmen auszuschlagen. Wir müssen aber bekennen, daß die vorgetragenen Angaben letztlich nur Wahrscheinlichkeitsbeweise sind und daß der direkte Nachweis, d. h. die eindeutige Nachweisung aufgesprühter Moleküle beim Einwandern durch die Ektodesmen von der Cuticula bis ins Gewebeinnere, noch aussteht. Es muß eingeräumt werden, daß Fixierlösungen und Farbstoffe pflanzenfremde Stoffe sind, die nur um der Darstellung der Ektodesmen oder anderer Strukturen willen

angewendet werden. Besprühen wir Blätter mit Nährsalzlösungen oder nur mit Wasser und dringen diese ins Gewebe ein, so ist doch anzunehmen, daß dieselben Eintrittspforten wie von den Fixierlösungen benutzt werden, d. h. daß die Ektodesmen auch für diese Substanzen die Transportbahnen ins Blattinnere darstellen.

Zusammenfassung

1. An Blättern von *Plantago major* werden mit der Sublimatmethode und dem Jod-Silber-Verfahren Ektodesmen in den Epidermisaußenwänden nachgewiesen. Ihre Formen werden beschrieben. Auch Innenwandplasmodesmen können mit der Sublimatmethode dargestellt werden. Sie bilden zusammen mit den Ektodesmen an bestimmten Blattorten wie den Kegelhaaren und den Geweben unter den größeren Nerven regelrechte Bahnensysteme.

2. Das Studium der Ektodesmenverteilung ergibt, daß einige Blattbezirke durch regelmäßiges und meist reiches Vorkommen von Ektodesmen ausgezeichnet sind. Dazu gehören die Epidermen über, unter und beiderseits der Blattrippen, die Schließzellen, die Kegelhaare und und die ihnen unmittelbar benachbarten Epidermiszellen sowie die sternförmig um Köpfchenhaare gelegenen Epidermiszellen. Diese Verteilung wird insbesondere in Aufsichtspräparaten deutlich. Dabei werden auch Anordnungen der Ektodesmen in Reihen erkennbar, die teils entlang den Antiklinen mehr oder weniger gewunden, teils unabhängig von den Zellgrenzen in geraden Linien, teils in Ringen um die Kegelhaare und ihre Fußzellen verlaufen. Für die Schließzellen ist die Anhäufung der Ektodesmen um den Spalt herum charakteristisch. Im Bereich der Intercostalfelder können ausgesprochen ektodesmenarme Bezirke sprunghaft mit ektodesmenreichen abwechseln.

3. In Versuchen, in denen anstelle der üblichen Fixierlösung nur Komponenten des Gilsongemisches zur Blattfixierung verwendet werden und die Nachbehandlung mit Jodkalium sowie die Anfärbung mit Pyoktanin unterbleibt, entstehen Kristalle und Intrusionen in Epidermisaußenwänden, deren Lokalisation mit der von Ektodesmen bei Anwendung der normalen Sublimatmethode übereinstimmt. Das gilt insbesondere für die Bezirke, in denen Ektodesmen regelmäßig zu finden sind. Aus den mikroskopischen Beobachtungen ergibt sich, daß eine Stoffaufnahme durch die Cuticula hindurch in die Zellwand sichtbar erfolgt ist.

4. In der Diskussion wird die augenfällige Beziehung der Ektodesmen zur Stoffaufnahme der Blätter von der Oberfläche her theoretisch analysiert. Mehrere Beobachtungen aus der Literatur über Stoffaufnahme und -abgabe der Blätter werden besprochen und in Zusammenhang mit dem Ektodesmenvorkommen gebracht. Insgesamt wird gefolgert, daß der Stoffaustausch zwischen Blattoberfläche und

Gewebeinnerem durch die Ektodesmen der Epidermisaußenwände hindurch stattfindet. Die Befunde stellen jedoch nur Indizien dar, der direkte Beweis steht noch aus.

Dank gebührt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung dieser Studien. Meiner technischen Assistentin, Fräulein BARBARA STREITZ, danke ich für die sorgfältige Mithilfe bei den zeitraubenden Untersuchungen.

Literatur

ARENS, K.: Die kutikuläre Exkretion des Laubblattes. Jb. wiss. Bot. **80**, 248—300 (1934).

BODE, H. R.: Beiträge zur Kenntnis allelopathischer Erscheinungen bei einigen Juglandaceen. Planta (Berl.) **51**, 440—480 (1958).

BOYNTON, D.: Nutrition by foliar application. Ann. Rev. Plant Physiol. **5**, 31—54 (1954).

BUSCALIONI, L., e G. POLLACCI: Ulteriori ricerche sull'applicazione delle pellicole di collodio allo studio di alcuni processi fisiologici delle piante ed in particular modo della transpirazione vegetale. Atti R. Ist. bot. Univ. Pavia, II. s. **7**, 127—170 (1901).

CURRIER, H. B., and S. STRUGGER: Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of Allium cepa L. Protoplasma **45**, 552—559 (1956).

FRANKE, W.: Ein Beitrag zur Nährstoffaufnahme durch Blätter. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 297—304 (1957).

FRENZEL, P.: Über die Porengröße einiger pflanzlicher Zellmembranen. Planta (Berl.) **8**, 642—665 (1929).

GARREAU: Recherches sur l'absorption et l'exhalation des surfaces aériennes des plantes. Ann. Sci. nat. Bot., XIII. s. **3** (1849). Zit. nach RUDOLPH 1925.

KERLING, L. P. C.: Het oppervlak van het levende blad en de phytopatholoog. Meded. Landbouwhogeschool Opzoekingsstat. Staat te GENT **24**, No 3—4, 577—592 (1959).

KRAUSE, H.: Beiträge zur Kenntnis der Wasseraufnahme durch oberirdische Pflanzenorgane. Öst. bot. Z. **84**, 241—270 (1935).

LAMBERTZ, P.: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. Planta (Berl.) **44**, 147—190 (1954).

NAUNDORF, G.: Neue Düngungsmethoden beim Kakao. Gordian **58**, H. 1398 (1959).

NIEUWENHUIS-V. UEXKÜLL-GÜLDENBAND, M.: Sekretionskanäle in den Kutikularschichten der extrafloralen Nektarien. Rec. Trav. bot. néerl. **11**, 291—311 (1914).

RENNER, O.: Theoretisches und Experimentelles zur Kohäsionstheorie der Wasserbewegung. Jb. wiss. Bot. **56**, 617—667 (1915).

RUDOLPH, K.: Epidermis und epidermale Transpiration. Bot. Archiv **9**, 49—94 (1925).

SCHIEFERSTEIN, R. H., and W. E. LOOMIS: Development of the cuticular layers in angiosperm leaves. Amer. J. Bot. **46**, 625—635 (1959).

SCHNEPF, E.: Untersuchungen über Darstellung und Bau der Ektodesmen und ihre Beeinflußbarkeit durch stoffliche Faktoren. Planta (Berl.) **52**, 644—708 (1959).

SCHUMACHER, W.: Über plasmodesmenartige Strukturen in den Epidermisaußenwänden. Jb. wiss. Bot. **90**, 530—545 (1942).

SCHUMACHER, W.: Über Ektodesmen und Plasmodesmen. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 335—342 (1957).

Schumacher, W., u. W. Halbsguth: Über den Anschluß einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Ein Beitrag zum Plasmodesmenproblem. Jb. wiss. Bot. **87**, 324—355 (1939).

Schumacher, W., u. P. Lambertz: Über die Beziehungen zwischen der Stoffaufnahme durch Blattepidermen und der Zahl der Plasmodesmen in den Außenwänden. Planta (Berl.) **47**, 47—52 (1956).

Sievers, A.: Untersuchungen über die Darstellbarkeit der Ektodesmen und ihre Beeinflussung durch physikalische Faktoren. Flora (Jena) **147**, 263—316 (1959).

Sievers, A.: Über den Einfluß von monochromatischem Licht auf die Darstellbarkeit der Ektodesmen. Z. Naturforsch. **15b**, 49—52 (1960).

Stålfelt, M. G.: Die cuticuläre Transpiration. Aus Handbuch der Pflanzenphysiologie, herausgeg. von W. Ruhland, Bd. III, S. 342—350. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

Steubing, L.: Beiträge zur Tauwasseraufnahme höherer Pflanzen. Biol. Zbl. **68**, 252—259 (1949).

Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora (Jena) **132**, 253—304 (1938a).

Strugger, S.: Die luminiszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. I. Mitt.: Die Methode und erste Beobachtungen. Flora (Jena) **133**, 56—68 (1938b).

Strugger, S.: Die luminiszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. III. Mitt. Untersuchungen an Helxine Soleirolii Req. Biol. Zbl. **59**, 409—442 (1939).

Strugger, S.: Studien über den Transpirationsstrom im Blatt von Secale cereale und Triticum vulgare. Z. Bot. **35**, 97—113 (1940).

Tukey jr., H. B., H. B. Tukey and S. H. Wittwer: Loss of nutrients by foliar leaching as determined by radioisotopes. Amer. Soc. hort. Sci. **71**, 496—506 (1958).

Wetzel, K.: Die Wasseraufnahme der höheren Pflanzen gemäßigter Klimate durch oberirdische Organe. Flora (Jena) **117**, 221—269 (1924).

Wiesner, J.: Studien über das Welken von Blüten und Laubsprossen. Ein Beitrag zur Lehre von der Wasseraufnahme, Saftleitung und Transpiration der Pflanzen. S.-B. Akad. Wiss. Wien **86**, 230—232 (1882).

Wittwer, S. H., and F. G. Teubner: Foliar absorption of mineral nutrients. Ann. Rev. Plant Physiol. **10**, 13—32 (1959).

Zamfirescu, N.: Cercetari asupra absorptiunii apei prin organelle aerienne ale plantelor. Bul. Minist. Agric. si Domenilor **3**, No 3—6 (1931). Zit. nach F. Gessner, Die Wasseraufnahme durch Blätter und Samen. Aus Handbuch der Pflanzenphysiologie, herausgeg. von W. Ruhland, Bd. III, S. 215—246. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

Privatdozent Dr. Wolfgang Franke, Bonn,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität,
Meckenheimer Allee 176

Planta 55, 424—437 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Kiel

WEITERE UNTERSUCHUNGEN ZUR WÄRMEAKTIVIERUNG DER SPORANGIOSPOREN VON *PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS*

II. Mitteilung

Von

HANSJÖRG RUDOLPH

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Juli 1960)

Im Rahmen der Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus* (HALBSGUTH und RUDOLPH 1959, RUDOLPH 1960) hatte sich ergeben, daß — wie von ROBBINS et al. (1942) und SOMMER und HALBSGUTH (1957) im Zusammenhang mit kleimungsphysiologischen Untersuchungen an diesem Sporenmaterial bereits angegeben wurde — die günstigste Aktivierungstemperatur 50° C beträgt[1]; es soll nun versucht werden, die im Anschluß an die Wärmevorbehandlung zu beobachtenden Reaktionen durch eine Änderung der Vorbehandlung zu verstärken. Dies kann bei der in Angriff genommenen weiteren Kausalanalyse von Bedeutung werden (vgl. S. 431).

Theoretisch besteht einerseits die Möglichkeit, durch längere Wärmevorbehandlungsdauer bei 50° C, andererseits durch höhere Vorbehandlungstemperaturen modifizierend einzugreifen.

A. Methodik

Die Untersuchungen wurden mit dem Stamm 1^+ von *Phycomyces blakesleeanus* durchgeführt. Bezüglich der methodischen Angaben kann auf RUDOLPH (1960) verwiesen werden. Soweit im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine speziellen Angaben gemacht werden, treffen die dort gegebenen Hinweise zu.

B. Untersuchungen

1. Verschiedene Wärmevorbehandlungstemperaturen bei konstanter Vorbehandlungsdauer von 3 min

1. Wirkung auf die Keimrate. SOMMER und HALBSGUTH (1957) haben am gleichen Stamm die Wirkung verschiedener Vorbehandlungstemperaturen auf die Keimung untersucht. Die in Abb. 1 dargestellten Werte fügen sich gut in die dort angegebenen Daten ein. Die Temperatur von 50° C wirkt optimal, 52° und 54° C werden auf die Dauer von 3 min

[1] Die nach bestimmten Bebrütungszeiten erhaltenen Keimprozentsätze wurden dort als Maß für die Wirkung der Wärmevorbehandlung benutzt.

relativ gut ertragen[1], höhere Temperaturen wirken stark schädigend. Eine Wärmevorbehandlung von 3 min bei 40° C hat nur eine sehr geringe fördernde Wirkung auf den Keimprozentsatz.

2. Wirkung auf den Gaswechsel wärmevorbehandelter Sporen. Durch Erhöhung der Wärmevorbehandlungstemperatur kann keine wesentliche Steigerung der O_2-Aufnahme erzielt werden. Eine Wärmevorbehandlung von 3 min bei 52° C wirkt sich schon leicht hemmend auf die O_2-Aufnahme aus.

Nach einer Vorbehandlung von 54° C beträgt die O_2-Aufnahme nur noch 72%, nach 56° C nur noch 46% des Wertes, der nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50° C nach 60 min erreicht wird.

Im Anschluß an höhere Vorbehandlungstemperaturen (54°, 56° C)

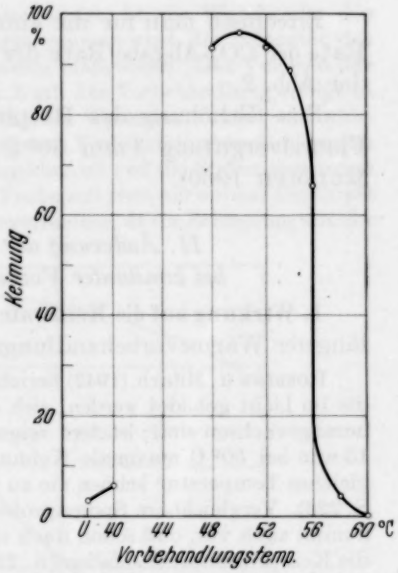


Abb. 1. Wirkung verschiedener Vorbehandlungstemperaturen auf die Keimrate. Vorbehandlungsdauer 3 min, Keimsubstrat: Standard-Nährlösung, Anzuchtstemperatur: 18 ± 0,5° C, Bebrütungstemperatur: 18 ± 0,5° C; *U* unvorbehandelte Kontrolle

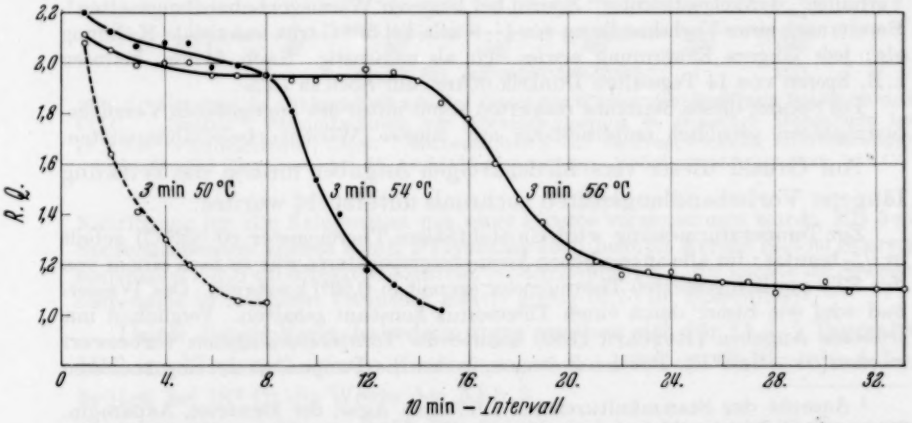


Abb. 2. Veränderung des Respiratorischen Quotienten nach Wärmevorbehandlung bei verschiedenen Temperaturen. Für die einzelnen 10 min-Intervalle ist die Rate CO_2-Abgabe/Rate der O_2-Aufnahme dargestellt; Vorbehandlungsdauer: 3 min. Versuchsbeginn („0") 2 min nach Zugabe der Nährlösung

hält der CO_2-Ausstoß — verglichen mit dem, wie er nach der Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50° C auftritt — länger an.

[1] Zur Standardisierung der Wärmevorbehandlung vgl. S. 427.

Errechnet man für die einzelnen 10 min-Intervalle die Quotienten: Rate der CO_2-Abgabe/Rate der O_2-Aufnahme, so ergeben sich die Werte der Abb. 2.

Eine Erhöhung des Respiratorischen Quotienten tritt auch nach Fluoridvergiftung 3 min 50° C wärmevorbehandelter Sporen auf (vgl. RUDOLPH 1960).

II. Änderung der Wärmevorbehandlungsdauer bei konstanter Vorbehandlungstemperatur (50° C)

1. Wirkung auf die Keimrate. Die Literaturangaben über die Wirkung längerer Wärmevorbehandlungzeiten bei 50° C sind uneinheitlich.

ROBBINS u. Mitarb. (1942) berichten, daß Sporen[1] von *Phycomyces blakesleeanus*, die im Licht gebildet werden, sich anders verhalten als solche, die in Dunkelheit herangewachsen sind; letztere zeigen nach einer Wärmevorbehandlungsdauer von 15 min bei 50° C maximale Keimung. Nach 2stündiger Vorbehandlung bei der gleichen Temperatur keimen sie zu 99%, nach 4 Std immer noch zu 87% (Fig. 1, S. 226). Vergleichbare Sporenproben zeigen aber nicht stets dieses Verhalten; es kommt auch vor, daß schon nach einer Wärmevorbehandlungsdauer von 135 min die Keimprozentsätze abfallen (S. 228).

Auch die im Licht herangezogenen Sporen zeigen nach einer Wärmevorbehandlung von 15 min bei 50° C maximale Keimung. Dagegen ist ihre Fähigkeit, längere Zeit diese Temperatur zu ertragen, geringer; nach einer 2stündigen Vorbehandlung keimen nur noch 52%, nach 4 Std nur noch etwa 18%. Die Sporen von Lichtkulturen sollen kleiner, länger und dünnwandiger sein als die von Dunkelkulturen.

SOMMER und HALBSGUTH (1957) berichten dagegen von einem völlig andersartigen Verhalten „dunkelgestimmter" Sporen bei längeren Wärmevorbehandlungszeiten[2]. Bereits nach einer Vorbehandlung von 4—8 min bei 50° C tritt maximale Keimung ein; jede längere Erwärmung erwies sich als ungünstig. Nach 64 min keimten z. B. Sporen von 14 Tage alten Dunkelkulturen nur noch zu 13%.

Die Sporen dieses Stammes reagierten somit unter den angegebenen Versuchsbedingungen erheblich empfindlicher auf längere Wärmevorbehandlungszeiten.

Auf Grund dieser verschiedenartigen Angaben mußte die Wirkung längerer Vorbehandlungszeiten nochmals untersucht werden.

Zur Temperaturmessung wird ein eichfähiges Thermometer (0—52° C) geteilt in $^1/_{10}$ benutzt; für alle angegebenen Versuchstemperaturen war es nach einem von der PTB amtlich geeichten Thermometer (geteilt in 0,02°) korrigiert. Das Wasserbad wird wie bisher durch einen Thermomix konstant gehalten. Verglichen mit früheren Angaben (RUDOLPH 1960) konnte die Temperaturkonstanz verbesssert werden (50 ± 0,05° C). Für den Zeitraum, in dem die Temperatur der eingetauchten

[1] Anzucht der Stammkulturen auf 1,5%igem Agar, der Dextrose, Asparagin, Vitamin B_1 und verschiedene anorganische Salze (einschließlich Spurenelemente) enthält; Kulturdauer 8 Tage, Kulturtemperatur 25° C, Keimsubstrat Stammnährlösung + 1% Agar (gereinigt), Bebrütungstemperatur 26° C, dunkel.

[2] Die Anzucht der Stammkulturen erfolgte auf Schwarzbrot bei Zimmertemperatur im Dunkeln (ohne besondere Kautelen). Bebrütungstemperatur = Zimmertemperatur (17—21° C), Keimsubstrat: vollständige Nährlösung. Versuch 101, S. 31; p_H der Nährlösung: 7,18, Sporenalter 14 Tage, keine näheren Angaben zur Methode der Wärmevorbehandlung und zur Temperaturkonstanz des Wasserbades.

Sporensuspension auf die Wasserbadtemperatur steigt, ist die Wandstärke des Gefäßes, in dem die Wärmevorbehandlung vorgenommen wird, die Intensität des Schüttelns und das Volumen der Sporensuspension maßgebend. Das Volumen der Sporensuspension beträgt deshalb stets etwa 5 ml. Die Vorbehandlung erfolgt in Jenaer Reagensgläsern (160×16 mm Fiolax-Glas) im Wasserbad; dabei wird während der 3 min fortlaufend geschüttelt[1]. Bei längeren Vorbehandlungszeiten werden die Reagensgläser danach an einem Stativ festgeklemmt und die Sporensuspension alle 10 min einmal durchgeschüttelt. Aus jeder Probe soll stets nur einmal abgeimpft werden, um ein Abkühlen der Restsuspension zu vermeiden, da die Beimpfung mit der

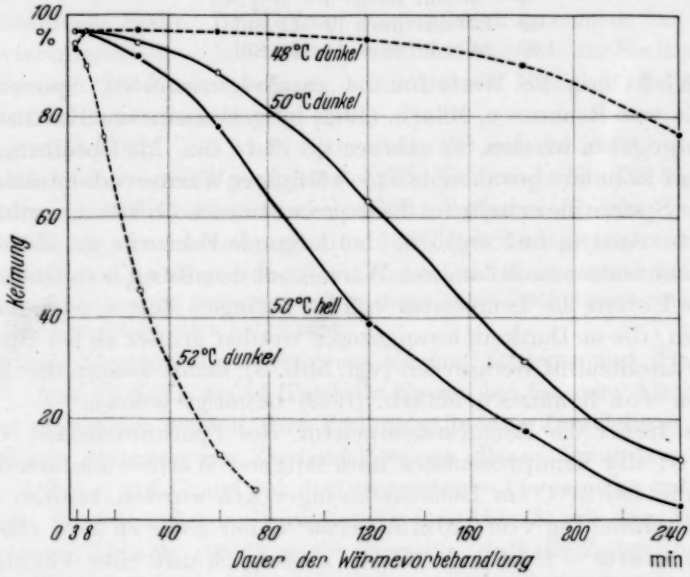


Abb. 3. Keimung in Abhängigkeit von der Dauer der Wärmevorbehandlung bei 48, 50 und 52° C. „Dunkel": Stammkulturen zur Sporengewinnung in absoluter Dunkelheit bei 18 ± 0,5° C herangezogen; „Hell": Stammkulturen zur Sporengewinnung im 12stündigen Licht-Dunkel-Rhythmus bei 18 ± 0,5° C herangezogen. Bebrütungstemperatur: 18° C

Nährlösung für die Keimproben mit einer Pipette vorgenommen wurde. Mit 5 ml Sporensuspension können somit 2 Versuchskolben beimpft werden (2,5 ml Sporensuspension + 2,5 ml doppelt konzentrierte Nährlösung); d. h. die Dichte der Sporensuspension ist in diesen Versuchen relativ gering ($0{,}2 \cdot 10^6$ Sporen/ml)[2].

Unter diesen Versuchsbedingungen ergeben sich für 11 ± 1 Tage alte Hell- und Dunkelkulturen (herangezogen bei 18° C auf Vollkornbrot, bebrütet bei 18° C) die Werte der Abb. 3.

Durch längere Wärmevorbehandlungszeiten wird nicht nur der Keimprozentsatz herabgesetzt, sondern auch die Keimungsgeschwindigkeit. Während nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bereits nach 6—6½ Std ausgezählt werden kann

[1] Diese Standardisierung der Wärmevorbehandlung ist bereits in früheren Arbeiten bei der Wärmevorbehandlung von 3 min eingeführt worden, ohne daß dort in der Methodik speziell darauf hingewiesen wurde.

[2] Vgl. S. 429.

— um diese Zeit treten schon die ersten Keimschläuche auf —, so ist nach einer Vorbehandlung von 2 Std der Keimungsprozeß so verlangsamt, daß erst nach 10—11 Std entschieden werden kann, ob eine Spore gekeimt ist oder nicht. Für jede Vorbehandlungszeit wurde deshalb in Vorversuchen die Abhängigkeit des Keimungsprozesses von der Zeit untersucht.

Die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse sind etwa die erreichten Endwerte. Die Auszählung erfolgt bei den einzelnen Wärmevorbehandlungen nach folgenden Zeiten:

3— 30 min nach 6— $6^1/_2$ Std
60—120 min nach 10—11 Std
180—240 min nach 14—16 Std

Vergleicht man die Werte für die „dunkelgestimmten" Sporen mit denen, die von ROBBINS u. Mitarb. (1942) bzw. SOMMER und HALBSGUTH (1957) angegeben werden, so nehmen sie etwa eine Mittelstellung ein.

Worauf könnte es beruhen, daß nach längerer Wärmevorbehandlungsdauer der Sporen die erhaltenen Keimprozentsätze so relativ verschieden sind. Eine Analyse hat ergeben, daß folgende Faktoren die Höhe des Keimprozentsatzes nach längerer Wärmevorbehandlung beeinflussen.

a) Die Potenz, die Temperatur von 50° C längere Zeit zu ertragen, ist bei Sporen, die im Dunkeln herangezogen werden, größer als bei Sporen, die unter Lichtzutritt heranreifen (vgl. Abb. 3); damit können die Beobachtungen von ROBBINS u. Mitarb. (1942) bestätigt werden.

b) Je höher die Anzuchtstemperatur des Sporenmaterials, desto geringer ist der Keimprozentsatz nach längerer Wärmevorbehandlung. Sporen, die bei 25° C im Dunkeln herangezogen wurden, keimen nach einer Vorbehandlung von 120 min bei 50° C nur noch zu 36% (Bebrütungstemperatur = 18° C). Im Mittel ist folglich mit einer Verminderung des Keimprozentsatzes um 27% — verglichen mit der Anzuchtstemperatur von 18° C — zu rechnen.

c) Mit steigender Bebrütungstemperatur fällt der Keimprozentsatz nach längerer Wärmevorbehandlung. Die Bebrütungstemperatur spielt selbstverständlich stets bei Keimversuchen eine wichtige Rolle. Sporen, die länger vorbehandelt sind, reagieren aber besonders empfindlich auf den Temperaturfaktor. Bei einer Bebrütungstemperatur von 25° C keimen nach einer Wärmevorbehandlung von 120 min bei 50° C im Mittel nur noch 33%. Die Keimschlauchbildung und das Wachstum der Keimschläuche werden jedoch durch höhere Bebrütungstemperaturen erheblich gefördert.

d) Die Aktivierungstemperatur von 50° C muß exakt eingehalten werden. Bereits eine Temperaturerhöhung um 0,5° C wirkt sich bei längerer Vorbehandlungsdauer nachteilig aus. In Versuch IXa_2 z. B. beträgt nach einer Wärmevorbehandlung von 120 min bei 50,5° C der Keimprozentsatz nur noch 32% (Anzuchtstemperatur der Stammkultur: 18° C, Bebrütungstemperatur: 18° C).

Die Keimprozentsätze nach längerer Vorbehandlungsdauer bei 48° C bzw. 52° C sind in Abb. 3 dargestellt.

Nach § 889 der Eichordnung vom 24.1.1942 beträgt die amtliche Eichfehlergrenze für Thermometer mit nicht benetzender thermometrischer Flüssigkeit — mit Ausnahmen — geteilt in 1° C von 0—50° C 0,7°. Eichfähige Thermometer überschreiten in keinem Punkt der Skala die Eichfehlergrenze. Bei den handelsüblichen, nicht eichfähigen Thermometern kann der tatsächliche Fehler das Doppelte der angegebenen Werte betragen.

e) Die Sporendichte spielt während der Wärmevorbehandlung eine entscheidende Rolle. Bei dichten Suspensionen kommt es bei längeren Aktivierungszeiten — falls nicht geschüttelt wird — zur Sedimentation der Sporen. Im Zusammenhang damit läßt die Fähigkeit, höhere Temperaturen länger zu ertragen, nach.

Versuch IX a_3[1]. 55×10^6 Sporen/ml, 120 min bei 50° C wärmevorbehandelt: Suspension geschüttelt, 69% Keimung. 55×10^3 Sporen/ml, 120 min bei 50° C wärmevorbehandelt: Suspension nicht geschüttelt 5% Keimung. Anzuchtstemperatur: 18°C, Bebrütungstemperatur: 18°C.

O_2-Mangel auf kleinstem Raum kann nicht die Ursache dieses Effektes sein. Denn unter anaeroben Bedingungen tritt dieser Abfall des Keimprozentsatzes nicht ein. Die Ursache ist noch unbekannt.

Damit könnten die Werte, wie sie von Sommer und Halbsguth (1957, Abb. 7), S. 31, für 14 Tage alte Sporen bei längeren Aktivierungszeiten angegeben werden, ihre Erklärung finden. In welchem Maße die einzelnen Faktoren am Zustandekommen dieses Resultates beteiligt sind, läßt sich auf Grund der dort angegebenen Daten nicht entscheiden.

Ein Vergleich der vorliegenden Werte (Abb. 3) mit den Daten von Robbins u. Mitarb. (1942) ergibt einerseits, daß der Zeitraum, in dem maximale Keimung erzielt wird, geringer ist, andererseits scheint es so, als ob die Sporen von Dunkelkulturen des von Robbins et al. (1942) benutzten Stammes eine längere Vorbehandlung besser ertragen.

Für die Wärmevorbehandlungstemperatur wird von Robbins u. Mitarb. (1942) $50 \pm 1°$ C angegeben; Daten über das benutzte Thermometer und dessen Abweichung fehlen. Somit wäre es möglich, daß die tatsächliche Vorbehandlungstemperatur noch etwas tiefer liegt. Wie wichtig aber die genaue Temperaturkonstanz in diesem Falle ist, ist bereits S. 428 diskutiert worden. Bei einer Wärmevorbehandlung von 48° C (vgl. Abb. 3) zeigen unter den hier gewählten Versuchsbedingungen die Sporen von Dunkelkulturen praktisch das Verhalten, wie es von Robbins u. Mitarb. (1942) beschrieben wird. Werden die bei Robbins et al. (1942) angegebenen Versuchsbedingungen gewählt, so keimen im Mittel nach einer Wärmevorbehandlung von 120 min bei $50 \pm 0{,}05°$ C nur noch 15%, nach 120 min bei $48 \pm 0{,}05°$ C aber $\sim 90\%$ der Sporen!

[1] In diesem Falle wurde mit einer Impfnadel 5 ml Standard-Nährlösung beimpft (vgl. S. 427).

Die Beobachtung, daß bei höheren Bebrütungstemperaturen das Keimschlauchwachstum gefördert wird, macht die Wahl der Bebrütungstemperatur von 26° C verständlich, denn von den Autoren werden solche Sporen als gekeimt gezählt, die einen Keimschlauch ausgebildet haben.

Im Rahmen dieser Arbeit gelten alle die Sporen als gekeimt, die in das Vacuolenstadium eingetreten sind (SOMMER und HALBSGUTH 1957, HALBSGUTH und RUDOLPH 1959, RUDOLPH 1960). Beide Angaben sind vergleichbar, da in Standard-Nährlösung normalerweise alle Sporen, die in das Vacuolenstadium eingetreten sind, auch Keimschläuche bilden — allerdings zu einem etwas späteren Zeitpunkt.

Die Angabe, daß erst nach einer Vorbehandlung von 15 min maximale Keimung eintritt, könnte im wesentlichen methodisch bedingt sein. Wie bereits S. 426f. dargestellt[1], ist in diesem Zusammenhang der Zeitraum von Bedeutung, in dem die Suspension auf die Vorbehandlungstemperatur gebracht wird. (Wandstärke des Reagensglases ? Wurde die Sporensuspension geschüttelt ?).

Bei Sporen, die direkt in vorgeheiztes Wasser eingebracht werden, genügt eine Vorbehandlungsdauer von 7,5 min, um maximale Keimung hervorzurufen[2] (ROBBINS et al. 1942, S. 228).

Nimmt man an, daß außerdem eine Vorbehandlungstemperatur <50° C vorliegt (vgl. z.B. die Werte für 48° C, Abb. 3), so würden sich etwa die Vorbehandlungszeiten bei beiden Stämmen, die zu maximaler Keimung führen, entsprechen. [48° C 8 min, Abb. 3; ROBBINS et al. (1942) 7,5 min.]

2. Wirkung längerer Vorbehandlungszeiten auf den Gaswechsel der Sporen. Schon eine Wärmevorbehandlungsdauer von 6 min bei 50° C wirkt sich hemmend auf die O_2-Aufnahme aus. Der Gaswechsel wurde nach verschieden langer Vorbehandlungszeit untersucht; zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach länger andauernder Wärmevorbehandlung die O_2-Aufnahme geringer wird, während der „Extra"-CO_2-Ausstoß länger anhält. Nach einer Vorbehandlungsdauer von 20 min z. B. ist der CO_2-Ausstoß erst nach 90 min wieder abgeklungen.

Durch längere Wärmevorbehandlungsdauer wird somit eine ähnliche, allerdings schwächere Wirkung wie durch höhere Vorbehandlungstemperaturen erzielt. Dabei ist die Möglichkeit aber wahrscheinlich geringer, Primärreaktionen zu erfassen.

[1] Vgl. auch ROBBINS et al. (1942), S. 228f.: "With this procedure the actual temperature to which the spores were subjected was less than 50° for a considerable part of the shorter periods of heating, because of the time required for the 5 ml of water, initially at room temperature, to reach 50°."

[2] Das heißt — zusammen mit der Angabe, daß maximale Keimung erst nach 15 min erfolgt (Sporensuspension kalt eingebracht) —, daß es mindestens 7,5 min dauert bis in diesem Fall die 5 ml Sporensuspension auf die Vorbehandlungstemperatur gebracht sind.

III. Die Wärmeaktivierung und die Produktion von Acetaldehyd

Die Bestimmung des Acetaldehyds erfolgte nach der Methode von STOTZ (1943) (modifiziert)[1].

Sporenmengen von 300—500 mg, suspendiert in 6 ml Nährlösung, werden in mit Glasperlen gefüllten Kulturvorrichtungen (vgl. Abb. 4) bei 21,5° C mit gereinigter Luft durchströmt[2]. In ebenfalls mit Glasperlen gefüllten, gleichartigen, jedoch kürzeren Absorptionsröhren kann dann in eisgekühlten, 2%igen Bisulfitvorlagen der Acetaldehyd abgefangen werden. Die Bisulfitvorlage wird direkt zur colorimetrischen Bestimmung benutzt. Als Kontrolle wird eine nur mit 6 ml Nährlösung beschickte Kulturvorrichtung

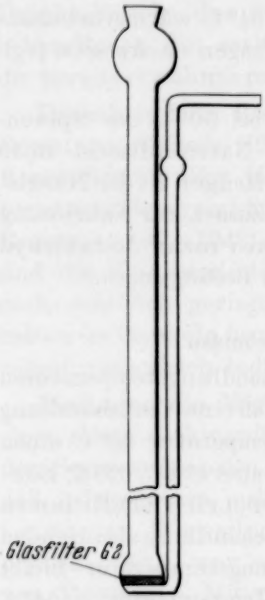


Abb. 4

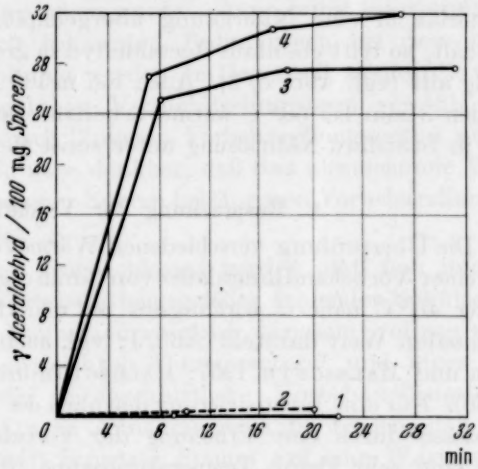


Abb. 5

Abb. 4. Kulturvorrichtung zur Acetaldehydgewinnung. Länge: 52 cm, Durchmesser: 1,4 cm

Abb. 5. Acetaldehydproduktion in Abhängigkeit von der Zeit. *1* Sporen unvorbehandelt, Substrat: Standard-Nährlösung; *2* Sporen 3 min bei 50° C wärmevorbehandelt, Substrat: Standard-Nährlösung; *4* Sporen 3 min bei 54° C wärmevorbehandelt, Substrat: Standard-Nährlösung; *3* Sporen 3 min bei 50° C wärmevorbehandelt, Substrat: Standard-Nährlösung + NaF m/10, p_H 4,18; Substratzusatz 5 min nach der Vorbehandlung; Versuchsbeginn 1 min nach Substratzusatz

durchströmt; die Reaktion dieser Bisulfitvorlage diente als Grundlage bei der Messung der Extinktion der gleichzeitig gelaufenen Versuchsprobe. Die Strömungsgeschwindigkeit der Luft pro Kulturvorrichtung beträgt 1 Liter/min. Mit einer Acetaldehydlösung bekannter Konzentration wird die Leistungsfähigkeit der Versuchsanordnung geprüft. 7 ml Nährlösung, die 0,18 γ Acetaldehyd/ml enthält, wird 10 min lang durchströmt; in der Bisulfitvorlage können im Mittel 91% der vorgelegten Acetaldehydmenge nachgewiesen werden (die zwangsläufige eintretende Verdünnung der Bisulfitlösung ist bei der Berechnung nicht berücksichtigt). Mit einer größeren zeitlichen Verschiebung eines auftretenden Effektes braucht man demnach nicht zu rechnen.

[1] Vgl. auch SUSSMAN et al. (1956).

[2] Nach der Wärmevorbehandlung werden die Sporen sofort abzentrifugiert und mit 6 ml Standard-Nährlösung aufgenommen.

Bei unvorbehandelten Sporen läßt sich selbst bei Mengen von 500 mg im Versuch kein Acetaldehyd in der Bisulfitvorlage nachweisen (vgl. Abb. 5, *1*).

Nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50° C tritt Acetaldehyd zwar im Substrat auf, allerdings in sehr geringem Maße (vgl. Abb. 5, *2*).

Wird jedoch die Sporensuspension 3 min bei 54° C wärmevorbehandelt, so läßt sich Acetaldehyd in relativ großen Mengen nachweisen (vgl. Abb. 5, 4).

Wird nach einer Vorbehandlung von 3 min bei 50° C das Sporenmaterial in eine Nährlösung übergeimpft, die Natriumfluorid m/10 enthält, so tritt ebenfalls Acetaldehyd in großen Mengen in der Nährlösung auf (vgl. Abb. 5, 3). Auch bei m/100 NaF-Zusatz zur Nährlösung bilden 3 min bei 50° C wärmevorbehandelte Sporen mehr Acetaldehyd als in Standard-Nährlösung unter sonst gleichen Bedingungen.

C. Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Überprüfung verschiedener Wärmevorbehandlungstemperaturen bei einer Vorbehandlungsdauer von 3 min ergab, daß eine Vorbehandlung unter 40° C nahezu wirkungslos ist und die Temperatur 50° C einen optimalen Wert darstellt (Abb. 1; vgl. auch ROBBINS et al., 1942; SOMMER und HALBSGUTH 1957; HALBSGUTH und RUDOLPH 1959; RUDOLPH 1960). Für eine Intensivierung der nach der Vorbehandlung ablaufenden Prozesse durch eine Erhöhung der Vorbehandlungstemperatur bleibt nur eine sehr kleine Temperaturspanne; denn Temperaturen $> 54°$ C wirken schon stark keimungshemmend.

Ein entsprechendes Ergebnis lieferten die Messungen der O_2-Aufnahme. Nach einer Vorbehandlungsdauer von 3 min bei 52° C tritt bereits eine schwache Hemmung der O_2-Aufnahme auf. Noch höhere Vorbehandlungstemperaturen (z. B. 54 und 56° C) wirken stärker hemmend. Die „Extra" CO_2-Abgabe wird jedoch durch Erhöhung der Vorbehandlungstemperatur verstärkt (vgl. Abb. 2).

Die nochmalige Untersuchung längerer Vorbehandlungszeiten bei 50° C ergab, daß die von ROBBINS et al. (1942) beschriebene unterschiedliche Wärmeresistenz hell und dunkel herangezogener Sporen auch an dem hier benutzten Stamm nachzuweisen ist. Im Licht herangezogene Sporen sind gegenüber längeren Vorbehandlungstemperaturen empfindlicher als im Dunkeln kultivierte. Ob allerdings die nach ROBBINS et al. (1942) vorhandene unterschiedliche Wandstärke die Ursache für die vorhandenen Resistenzunterschiede ist oder ob durch Licht innere Umstimmungen der Sporen eintreten, kann vorerst nicht entschieden werden.

Der rasche Abfall des Keimprozentsatzes nach längeren Vorbehandlungszeiten, wie er von SOMMER und HALBSGUTH (1957) dargestellt wurde, ist wahrscheinlich durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren bedingt worden, die in ihrem Ausmaß und ihren Wirkungen damals noch nicht übersehen werden konnten[1]. Dazu gehören die Temperatur der Vorkultur, die Bebrütungstemperatur, die Suspensionsdichte (bzw. das Durchschütteln der Suspensionen während länger andauernder Vorbehandlung), die exakte Temperaturkonstanz des Wasserbades sowie die bereits erwähnte resistenzmindernde Wirkung des Lichts.

Die relativ hohe Resistenz „dunkelgestimmter" Sporen — wie sie von ROBBINS u. Mitarb. (1942) angegeben wurde — kann selbst bei optimaler Konstellation aller bis jetzt bekannten Bedingungen bei dem hier benutzten Stamm nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, werden die von ROBBINS et al. (1942) angegebenen Versuchsbedingungen gewählt, so sind die Keimprozentsätze nach längeren Vorbehandlungszeiten sogar noch erheblich geringer. Es wäre denkbar, daß das abweichende Verhalten im Dunkeln herangezogener Sporen bei längeren Vorbehandlungszeiten methodisch bedingt ist.

Muß aber die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß sich infolge eines relativ dickwandigen Vorbehandlungsgefäßes, fehlenden Schüttelns der Sporensuspension der Temperaturausgleich langsam vollzog und daß infolge eines nicht nachgeeichten Thermometers[2] und eines inkonstanten Wasserbades die durchschnittliche Vorbehandlungstemperatur $< 50^0$ C war, so müßte die Annahme gemacht werden, daß der von ROBBINS u. Mitarb. (1942) benutzte Stamm auf eine Wärmevorbehandlung träger reagiert und insgesamt eine größere Wärmeresistenz besitzt.

Eine Verlängerung der Wärmevorbehandlungszeit auf 6 min macht sich in meinen Versuchen bereits in einer Verringerung der O_2-Aufnahme bemerkbar. Der Respiratorische Quotient wird jedoch durch längere Vorbehandlungszeiten ebenfalls erhöht.

Es kann sowohl durch höhere Vorbehandlungstemperaturen (z. B. 54^0) wie durch längere Vorbehandlungsdauer (z. B. 20 min) der CO_2-Ausstoß, der normalerweise im Anschluß an die Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50^0 C auftritt, verstärkt werden. Da die Wirkung längerer Vorbehandlungszeiten bei 50^0 C in diesem Zusammenhang nicht stärker ist als die einer höheren Vorbehandlungstemperatur von z. B. 54^0 C und darüberhinaus noch die geringere Wahrscheinlichkeit bietet, Primärreaktionen zu erfassen, ist bei den weiteren Untersuchungen — falls nötig — die

[1] Der Rahmen war von den Autoren damals absichtlich erst einmal weit abgesteckt, um praktisch alle möglichen Substratfaktoren zu erfassen.

[2] Vgl. S. 429.

Erhöhung der Vorbehandlungstemperaturen einer Verlängerung der Vorbehandlungsdauer vorzuziehen.

Augenfällig ist die Beziehung, die zwischen der Acetaldehydproduktion und der Erhöhung des Respiratorischen Quotienten besteht.

Unvorbehandelte Sporen bilden kein „Extra" CO_2, Acetaldehyd ist nicht nachzuweisen. Nach einer Wärmevorbehandlung von 3 min bei 50° C wird der Respiratorische Quotient erhöht, der CO_2-Ausstoß klingt aber schon nach etwa 65 min wieder ab. Acetaldehyd tritt im Substrat auf, allerdings in relativ geringen Mengen. Eine Wärmevorbehandlung von z. B. 3 min bei 54° C hat zur Folge, daß der CO_2-Ausstoß erheblich länger anhält und große Mengen Acetaldehyd im Substrat nachzuweisen sind. Der Zusatz von NaF zur Nährlösung ruft eine Erhöhung des Respiratorischen Quotienten bei 3 min 50° C wärmevorbehandelten Sporen hervor. Die Wirkung von NaF m/10 ist dabei erheblich stärker als die von NaF m/100. Auch nach m/10 NaF-Zusatz läßt sich Acetaldehyd in reichem Maße im Substrat nachweisen.

In den bisher untersuchten Fällen ist der Acetaldehydausstoß nur über kurze Zeit zu beobachten. In den ersten 8—10 min nach Versuchsbeginn tritt die Hauptmenge aus, und nach etwa 30—35 min wird praktisch kaum Acetaldehyd mehr in die Nährlösung ausgeschieden.

Falls man im Rahmen der möglichen Ursachen für die R. Q.-Werte > 1 im Anschluß an die Wärmevorbehandlung die „Extra" CO_2-Produktion zusammen mit dem Auftreten von Acetaldehyd diskutiert (den „klassischen Abbauweg" der Glucose vorausgesetzt), so bietet sich als Erklärung zuerst die Möglichkeit an, daß durch den Wärmeschock die anaerobe Phase des Glucoseabbaues eingeleitet wird, ohne daß ein rascher oxydativer Endabbau der in dieser Phase anfallenden Produkte gewährleistet ist (vgl. auch SUSSMAN et al. 1956). Ob dabei der Acetaldehyd auch als Wasserstoffacceptor fungiert und es zur Bildung von Äthanol kommt, wäre noch zu prüfen.

Wie aber bereits früher (RUDOLPH 1960) dargestellt, lassen die Ergebnisse der Versuche mit Natriumfluorid kaum eine Deutung im Sinne des Embden-Meyerhof-Schemas zu!

Für wärmevorbehandelte Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* konnte nachgewiesen werden, daß auch die Veratmung von Brenztraubensäure und Ammoniumacetat durch NaF stark gehemmt wird. Daraus wurde gefolgert, daß die keimungshemmende Wirkung von Fluorid zumindest nicht nur auf der Blockierung der Enolase beruhen kann (eventuell auch Hemmung der Bernsteinsäuredehydrierung und Blockierung des Cytochrom c ? Vgl. Lit. RUDOLPH 1960).

Mit der Annahme, daß das Fluorid sensitive Stellen im oxydativen Endabbau stärker blockiert als die Enolase bzw. die Enolasehemmung

erst zeitlich später einsetzt, könnte zwar der Anstieg des Respiratorischen Quotienten und die verstärkte Acetaldehydbildung erklärt werden. Jedoch ist dann die größere CO_2-Produktion wärmevorbehandelter NaF-vergifteter Sporen unter anaeroben Bedingungen schwer zu deuten.

Wird nach NaF-Vergiftung eine Blockierung der Enolase als gegeben betrachtet, dann kann die verstärkte CO_2-Entwicklung nicht die Folge der Decarboxylierung von Brenztraubensäure sein, die nach dem Embden-Meyerhof-Schema entsteht; die Bildung von Acetaldehyd auf diesem Wege ist damit ebenfalls unmöglich. So wird eventuell ein anderer Abbauweg der Glucose diskutiert werden müssen (vgl. RUDOLPH 1960). Eine Entscheidung können jedoch erst weitere Versuche bringen.

Acetaldehyd wirkt nach SOMMER und HALBSGUTH (1957) nicht keimungsfördernd auf unvorbehandelte Sporen von *Phycomyces blakesleeanus*. BRINCKMANN (1959) gibt im Konzentrationsbereich von 0,016 bis 0,065 m eine *Förderung* der Keimung unvorbehandelter Sporen durch Acetaldehyd von etwa 35% an; höhere Konzentrationen wirken nach BRINCKMANN ungünstig.

Eigene Versuche haben ergeben, daß Acetaldehyd[1] in geringen Mengen in starkem Maße keimungsfördernd auf unvorbehandelte Sporen wirkt[2]. Es treten dabei Keimprozentsätze von etwa 90% auf. Diese keimungsfördernde Wirkung von Acetaldehyd ist mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen gut in Einklang zu bringen. Auch das Oxydationsprodukt des Acetaldehyds — die Essigsäure — wirkt nach ROBBINS u. Mitarb. (1942) und SOMMER und HALBSGUTH (1957) stark keimungsfördernd auf unvorbehandelte Sporen. Es wäre möglich, daß zwischen den Wirkungsmechanismen der Keimungsförderung beider Substanzen enge Beziehungen bestehen.

Es erscheint vorerst wahrscheinlich, daß durch die Wärmevorbehandlung erste Kohlenhydratabbauprozesse eingeleitet werden[3], wobei noch unklar ist, welcher Abbauweg vorliegt. Die Wärmeaktivierung könnte dann in der Beeinflussung eines der Regulative dieser einleitenden Prozesse bestehen. Über diese Möglichkeit wird im Zusammenhang mit den Untersuchungen über den Phosphathaushalt der Sporen zu diskutieren sein.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

1. Die Wirkung verschiedener Vorbehandlungstemperaturen auf Keimung und Gaswechsel der Sporen wurde untersucht. Während bei Temperaturen $> 50^0$ C der Keimprozentsatz und die O_2-Aufnahme geringer werden, hält der CO_2-Ausstoß länger an.

[1] E. Merck.

[2] Hierüber wird in Kürze ausführlicher zu berichten sein.

[3] Vgl. hierzu auch die Ergebnisse von SUSSMAN et al. (1956) an *Neurospora*-Ascosporen.

2. Die Wirkung längerer Wärmevorbehandlungszeiten auf die Keimrate wurde überprüft und es wurde versucht, die Unstimmigkeiten, die zwischen den Ergebnissen von SOMMER und HALBSGUTH (1957) und ROBBINS u. Mitarb. (1942) bestehen, zu klären.

3. Die Potenz der Sporen, längere Zeit die Temperatur von 50° C zu ertragen, wird durch die Temperatur, durch die Lichtverhältnisse während der Vorkultur und durch die Suspensionsdichte während der Wärmevorbehandlung bestimmt.

Bebrütungstemperatur und geringe Abweichung von der Vorbehandlungstemperatur sind in diesem Zusammenhang für die erhaltenen Keimprozentsätze von großer Bedeutung.

4. Unvorbehandelte Sporen scheiden keinen Acetaldehyd in die Nährlösung aus. Geringe Mengen sind nach einer Vorbehandlung von 3 min bei 50° C, relativ große Mengen nach einer Vorbehandlung von 3 min bei 54° C nachzuweisen. Relativ große Acetaldehydmengen entstehen jedoch auch nach Fluoridvergiftung (m/10 NaF) bei 3 min 50° C wärmevorbehandelten Sporen.

Frl. WILMA REHDER sei für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche gedankt.

Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. An dieser Stelle möchte ich dafür meinen besonderen Dank aussprechen.

Literatur

BRINCKMANN, M.: Ein Beitrag zum Problem der Wirkung heißsterilisierter Medien auf Organismen. Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a. Main 1959.

GODDARD, D. R.: The reversible heat activation inducing germination and increased respiration in the ascospores of Neurospora tetrasperma. J. gen. Physiol. **19**, 45—60 (1935).

GODDARD, D. R.: The reversible heat activation of respiration in Neurospora. Symp. Quant. Biol. **7**, 362—376 (1939).

GODDARD, D. R., and P. E. SMITH: Respiratory block in the dormant spores of Neurospora tetrasperma. Plant Physiol. **13**, 241—264 (1938).

HALBSGUTH, W., u. H. RUDOLPH: Untersuchungen über die Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von Phycomyces blakesleeanus. I. Arch. Mikrobiol. **32**, 296—308 (1959).

JAMES, W. O.: The use of respiratory inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **4**, 59—90 (1953).

LOHMANN, K., u. O. MEYERHOF: Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure. Biochem. Z. **273**, 60—72 (1934).

ROBBINS, W. J., V. W. KAVANAGH and F. KAVANAGH: Growth substances and dormancy of spores of Phycomyces. Bot. Gaz. **104**, 224—242 (1942).

RUDOLPH, H.: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Sporangiophoren von Phycomyces blakesleeanus. Biol. Zbl. **77**, 385—437 (1958).

Rudolph, H.: Weitere Untersuchungen zur Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von Phycomyces blakesleeanus. Planta (Berl.) **54**, 505—520 (1960).

Sommer, L., u. W. Halbsguth: Grundlegende Versuche zur Keimungsphysiologie von Pilzsporen. Forschungsberichte des Wirtschafts- und Verkehrsministeriums Nordrhein-Wesfalen Nr 411, 1957.

Stotz, E.: A colorimetric determination of acetaldehyde in blood. J. biol. Chem. **148**, 585—591 (1943).

Sussman, A. S., J. R. Distler and J. S. Krakow: Metabolic aspects of Neurospora activation and germination. Plant Physiol. **31**, 126—135 (1956).

Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer: Manometric techniques. Minneapolis: Burgess Publ. 1949.

Warburg, O., u. W. Christian: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Naturwissenschaften **29**, 590 (1941).

Warburg, O., u. W. Christian: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. **310**, 384—421 (1942).

Eichordnung vom 24. 1. 1942 der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt.

Dr. Hansjörg Rudolph,
Botanisches Institut der Universität, Kiel, Düsternbrooker Weg 17

Planta 55, 438—450 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

DIE STEUERUNG DES HYPOKOTYLWACHSTUMS BEI DEN KEIMLINGEN VON *LACTUCA SATIVA* L. DURCH SICHTBARE STRAHLUNG

Von

H. Mohr und M. Wehrung

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Juli 1960)

1. Einleitung

Ähnlich wie bei der vorangegangenen Arbeit mit Keimlingen von *Lactuca sativa* L. (Mohr und Noblé 1960) gingen wir auch bei der hier vorliegenden Arbeit von Fragen aus, die während der Untersuchungen zur Photomorphogenese der Keimlinge von *Sinapis alba* L. entstanden waren (Mohr 1957, 1959a, b, Mohr und Pichler 1960). Bei *Sinapis alba* werden alle von uns untersuchten Photomorphosen über die „Niederenergie-Reaktion" (NER)[1] und über die „Hochenergie-Reaktion" (HER)[1] gesteuert (vgl. Mohr 1960). Die beiden Reaktionssysteme, die bei den *Sinapsis*-Keimlingen stets synergistisch wirken, lassen sich nur unter Schwierigkeiten physiologisch voneinander trennen. Um die bei *Sinapsis alba* erhaltenen Daten zur HER, z. B. das Wirkungsspektrum, zu bestätigen, haben wir nach einem Objekt gesucht, bei dem im Rahmen der Photomorphogenese die HER weitgehend unabhängig von der NER untersucht werden kann. Wir mußten also eine Photomorphose finden, die unter „Niederenergie-Bedingungen" praktisch nicht auftritt, unter „Hochenergie-Bedingungen" jedoch gut ausgeprägt ist. Das gesuchte Objekt sollte obendrein zu einer Pflanzenfamilie gehören, die im System möglichst weit von den Cruciferen entfernt steht. Denn wir stellten uns die für die allgemeine Bedeutung unserer Befunde wesentliche Frage, ob die HER auch außerhalb der Familie der Cruciferen vorkommt. Als ein sehr günstiges Objekt erwiesen sich die schon so oft untersuchten Keimlinge von *Lactuca sativa* L.

2. Methodik

a) Material. Wir verwendeten dieselbe, sehr homogene Achänenpopulation von *Lactuca sativa* L. (Grand Rapids, tip burn resistant strain) wie in der vorangegangenen Arbeit (Mohr und Noblé 1960). Die Achänen dieser Varietät sind obligate Lichtkeimer. Der Lichteinfluß auf die Keimung geht über das Reversible HR-DR-Reaktionssystem. Wir mußten deshalb die gequollenen Achänen saturierend mit Hellrot (HR)[1] bestrahlen.

[1] Folgende Abkürzungen werden verwendet: NER = Niederenergie-Reaktion; HER = Hochenergie-Reaktion; HR = Hellrot; DR = Dunkelrot.

b) Bestrahlungsanlagen. Die verwendeten Bestrahlungsanlagen sind bei Mohr und Schoser (1959) genau beschrieben (Interferenzfilter-Monochromatoranlage und Standardfelder für HR und DR), ebenso die Bedingungen und die Instrumente für die Messung der Quantenstromdichte. Das DR wurde mit den Cellophan-Farbfiltern hergestellt, das HR mit Hilfe der roten TL 40 W/15-Röhren von Philips, das „Blaulicht" mit Hilfe der TL 40 W/18-Röhren von Philips. Wenn „Weißlicht" angegeben ist, handelt es sich um die Strahlung der HNT-Röhren von Osram (Messung der Beleuchtungsstärke mit dem großen Beleuchtungsmesser von Lange, Berlin-Zehlendorf).

c) Der allgemeine Versuchsansatz. Alle Versuche laufen bei 25° C ab. Die Achänen werden auf 3 Lagen Keimpapier (Charybdis-Löschpapier 9142/11) in farblosen Kunststoffdosen („Gerda"-Kühlschrankbehälter) ausgesät. Das Keimpapier wird vor der Saat 12 Std in destilliertem Wasser gequollen, dann wird das freie Wasser abgegossen. Pro Dose säen wir 25 Achänen etwa äquidistant auf 3 konzentrischen Kreisen vom Radius 2,5, 1,5 und 0,5 cm aus. Nach der Saat werden 2 ml destilliertes Wasser von 25° C hinzugefügt und die Dosen ins Dunkle gebracht. Bei Beendigung der Versuche ist stets noch freies Wasser vorhanden. Die relative Luftfeuchtigkeit in den Behältern ist also während der Dauer der Versuche hoch und konstant. Dies ist für die Reproduzierbarkeit der Versuche entscheidend wichtig. — Vorversuche ergaben, daß es günstig ist, 3 Std nach der Aussaat die gequollenen Achänen mit 5 min HR (Standardfeld) zu bestrahlen. Dadurch wird bei allen überhaupt keimfähigen Achänen die Keimung induziert. 36 Std nach der Aussaat haben die Hypokotyle der jungen Keimlinge eine Länge von etwa 2,6 mm. Zu diesem Zeitpunkt beginnen unsere Bestrahlungsprogramme. Unsere physiologische Meßgröße ist die Hypokotyllänge. Es wird das Hypokotyl unter dem Stereomikroskop durch je einen Schnitt am Ansatz der Kotyledonen und am Ansatz der Wurzel isoliert und seine Länge auf einen halben Millimeter genau bestimmt.

d) Fehlerbetrachtung. Pro Dose werden 25 Achänen ausgesät, 20 Keimlinge werden ausgewertet. Die 5 kleinsten Keimlinge (hinsichtlich der Länge des Hypokotyls) werden verworfen. In den Tabellen und Kurven dieser Arbeit sind stets Mittelwerte aus mehreren Parallelversuchen angegeben. Die Variabilität der verwendeten Population hinsichtlich der Hypokotyllänge ist befriedigend gering. Bei einem arithmetischen Mittel aus 80 genau gleich behandelten Keimlingen beträgt der relative mittlere Fehler des Mittelwerts nicht mehr als 5%. Bei dem Mittelwert aus den verschiedenen Parallelexperimenten zu jeder Wellenlänge des Wirkungsspektrums ist die Streuung erheblich größer und zwar auf Grund der bisher nicht vermeidbaren Variation der physikalischen Faktoren (vgl. Abb. 6).

3. Experimentelle Ergebnisse

a) Einige Grundexperimente mit HR. Wir verfolgen das Längenwachstum des Hypokotyls im Dunkeln (Abb. 1) und wir finden, daß die Wachstumsgeschwindigkeit während des untersuchten Zeitraums von 48 Std (36—84 Std nach Aussaat) annähernd konstant ist. — Aus Vorversuchen wissen wir, daß Weißlicht das Längenwachstum des *Lactuca*-Hypokotyls stark hemmt. Die Annahme liegt nahe, daß das Hypokotylwachstum auch hier wenigstens zum Teil über das Reversible HR-DR-Reaktionssystem gesteuert wird, wie wir dies von *Phaseolus vulgaris* (Downs 1955) oder *Sinapis alba* (Mohr 1959b) her kennen. Um so mehr überrascht es uns, daß die Wachstumsgeschwindigkeit

des Hypokotyls der *Lactuca*-Keimlinge im Dauerhellrot niedriger Intensität (Abb. 1) nach einer anfänglichen Verminderung praktisch wieder dieselbe wird wie im Dunkel. Offenbar „adaptiert" sich das Hypokotyl schnell an die herrschenden Strahlungsbedingungen. Ganz ähnlich verhalten sich nach Lockhart und Gottschall (1959) die Sproßachsen

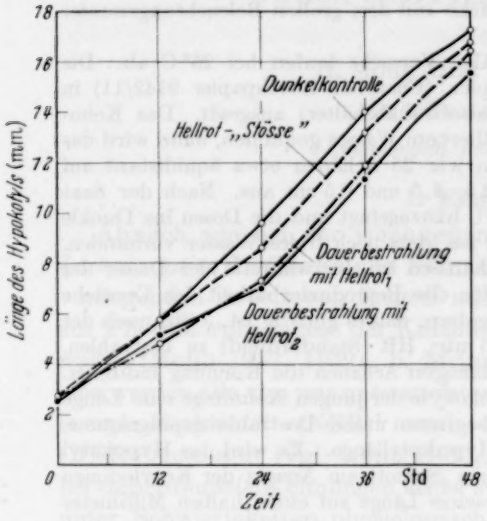


Abb. 1

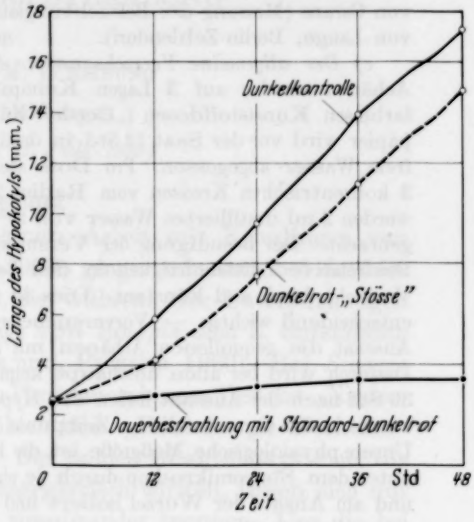


Abb. 2

Abb. 1. Einige Grundexperimente zur Wachstumsgeschwindigkeit des *Lactuca*-Hypokotyls im Hellrot-Feld. Die Experimente beginnen 36 Std nach Aussaat (= Zeitpunkt 0). Die Hellrot-„Stöße" werden vom Zeitpunkt 0 an im Abstand von 6 Std gegeben, jeweils 5 min $Hellrot_1$. $Hellrot_1$: Hellrotfeld mit einer Intensität von 160 erg/cm² · sec. $Hellrot_2$: Hellrotfeld mit einer Intensität von 1340 erg/cm² · sec. (Da unsere Thermosäule infolge des unvermeidbaren „Cosinusfehlers" stark konvergente Strahlung nicht zuverlässig mißt, vgl. Mohr und Schoser 1959, liegt die „wahre" Intensität, die in den Hellrotfeldern auf den Keimling fällt, erheblich höher. Das *Verhältnis* der Intensitäten, also 16:134, können wir jedoch mit hoher Genauigkeit feststellen.)

Abb. 2. Einige Grundexperimente zur Wachstumsgeschwindigkeit des *Lactuca*-Hypokotyls im Dunkelrot-Standardfeld (vgl. Mohr und Schoser 1959). Die Dunkelrot-„Stöße" werden vom Zeitpunkt 0 an im Abstand von 6 Std gegeben, jeweils 5 min Standard-Dunkelrot

von Erbsenkeimpflanzen im hellroten Dauerlicht von relativ niedriger Intensität. — Auch wenn wir die Intensität des Hellrot auf das Achtfache steigern ($Hellrot_2$, Abb. 1) beobachten wir diese „Adaptationserscheinung", und auch bei Anwendung von Hellrot-„Stößen" ergibt sich im Prinzip derselbe Verlauf der Wachstumskurve (Abb. 1). Wir können also zusammenfassend sagen, daß entgegen den Erwartungen die *Lactuca sativa*-Keimlinge hinsichtlich ihres Längenwachstums über einen längeren Zeitraum hinweg durch Hellrot nicht wesentlich beeinflußt werden können. Es scheint, daß das Hypokotylwachstum nach der anfänglichen Hemmung weitgehend unabhängig von der NER wird. Also muß die

auf Grund der Vorversuche uns bekannte starke Hemmung des Hypokotylwachstums durch sichtbare Strahlung über ein anderes Reaktionssystem erfolgen, und wir vermuten, daß es sich um die uns von *Sinapis alba* her bekannte HER (das Blau-DR-Reaktionssystem) handelt.

b) Einige Grundexperimente mit DR. Es muß nun, entsprechend den Hellrot-Versuchen, geprüft werden, ob die Keimlinge hinsichtlich ihres Hypokotylwachstums auf DR reagieren. Dies ist in der Tat der

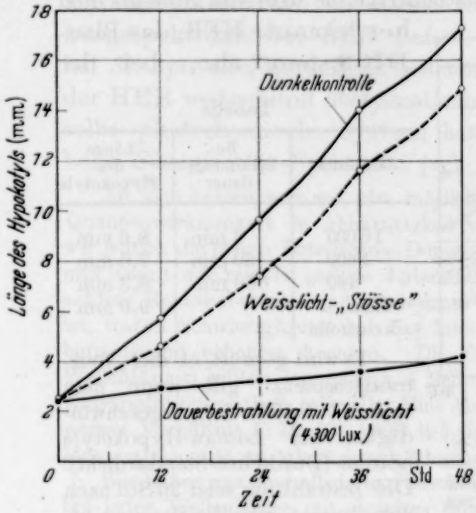


Abb. 3

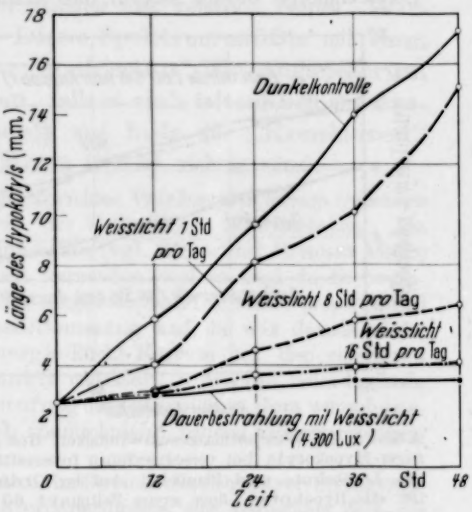


Abb. 4

Abb. 3. Die Wachstumsgeschwindigkeit des *Lactuca*-Hypokotyls bei Bestrahlung mit „Weißlicht" (HNT-Röhren, 4300 Lux). Die „Weißlicht-Stöße" werden vom Zeitpunkt 0 an im Abstand von 6 Std gegeben, jeweils 5 min „Weißlicht"

Abb. 4. Die Wachstumsgeschwindigkeit des *Lactuca*-Hypokotyls bei verschiedener Dauer der täglichen Bestrahlungszeit mit „Weißlicht" (HNT-Röhren, 4300 Lux). Bei 16 Std Licht pro Tag ist die maximale Hemmwirkung fast schon erreicht

Fall (Abb. 2). Im Dauer-DR (Standard-Feld) ist die Wachstumsgeschwindigkeit des Hypokotyls äußerst gering, während die Keimlinge auf ein Bestrahlungsprogramm mit DR-„Stößen" ganz ähnlich wie im HR reagieren. Offenbar wirkt sich unter diesen Umständen im wesentlichen der „HR-Anteil" des DR aus. — Unter „Hochenergie-Bedingungen" läßt sich also mit DR, im Gegensatz zu HR, das Hypokotylwachstum weitgehend hemmen.

c) Einige Grundexperimente mit „Weißlicht" (HNT-Leuchtstoffröhren). Ganz ähnlich wie im DR-Feld verhält sich die Wachstumsgeschwindigkeit des Hypokotyls auch im „Weißlicht"-Feld bei höherer Intensität (Abb. 3). Im Dauerlicht ist die Wachstumsgeschwindigkeit sehr gering, bei Anwendung von „Weißlicht-Stößen" treten ganz ähnliche Verhältnisse wie im HR auf. Da unser „Weißlicht" sehr wenig DR

enthält, dürfen wir annehmen, daß der „blaue" Anteil in dem „Weißlicht" die starke Hemmwirkung ausübt. In Abb. 4 ist gezeigt, daß die Hemmwirkung des Weißlichts um so ausgeprägter ist, je länger wir täglich bestrahlen. Es kann kein Zweifel sein, daß auch die Blaulichtwirkung, die wir aus den Experimenten herauslesen können, über eine Hochenergiereaktion erfolgt.

Zusammenfassend können wir auf Grund der eben dargestellten Grundexperimente bereits sagen, daß wahrscheinlich die uns von *Sinapis alba* her bekannte HER, das Blau-DR-System also, bei der Hemmung des Hypokotylwachstums der *Lactuca*-Keimlinge die entscheidende Steuerfunktion ausübt.

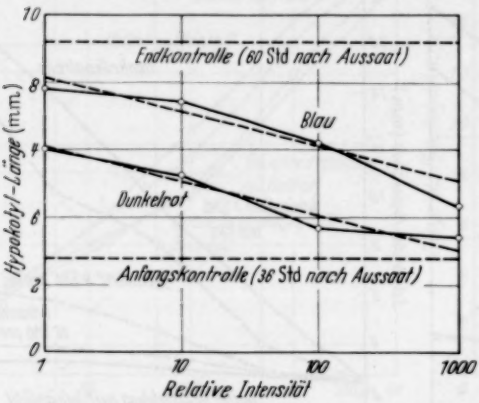


Abb. 5. Die Wachstumsgeschwindigkeit des *Lactuca*-Hypokotyls bei verschiedenen Intensitäten im Dunkelrot- und Blaufeld. Auf der Ordinate ist die Hypokotyl-Länge zum Zeitpunkt 60 Std nach Aussaat angegeben. Die Bestrahlung setzt 36 Std nach der Aussaat ein (Anfangs-Kontrolle) und dauert 15 Std (Blaufeld) bzw. 16 Std (Dunkelrotfeld) an. Die Endkontrolle gibt die im Dunkeln 60 Std nach der Aussaat erreichte Hypokotyllänge an. Relative Intensität 1000 im Blaufeld = 3500 erg/cm² · sec. Relative Intensität 1000 im Dunkelrotfeld = 16000 erg/cm² · sec

Tabelle

Intensität	Bestrahlungsdauer	Länge des Hypokotyls
16000	6 min	8,6 mm
1600	60 min	7,6 mm
160	600 min	6,3 mm
Dunkelkontrolle		9,0 mm

Es wird geprüft, ob das „Reizmengengesetz" gilt, wenn man mit DR die Wachstumsgeschwindigkeit der *Lactuca*-Hypokotyle hemmt (Dunkelrot-Standardfeld). Die Bestrahlung setzt 36 Std nach der Aussaat ein, die Messung erfolgt 60 Std nach der Aussaat.

d) Die Prüfung auf das „Reizmengengesetz". Man kann erwartungsgemäß zeigen (Tabelle), daß das „Reizmengengesetz" auch in diesem Fall einer HER nicht gilt, d. h. es kommt nicht nur auf die Zahl der eingestrahlten Quanten an, sondern auch darauf, wie diese Strahlung zeitlich verteilt ist. Die HER kann eben nur nachgewiesen werden — wie uns auch die Abb. 2 zeigt —, wenn über einen gewissen längeren Zeitraum hinweg wirksame Strahlung von genügend hoher Intensität eingestrahlt wird.

e) Die Intensitätsabhängigkeit der Reaktion. Als Vorbereitung für die Experimente zum Wirkungsspektrum wollten wir uns wenigstens im DR- und im Blaufeld einen Überblick darüber verschaffen, wie das Hypokotylwachstum von der Intensität der Strahlung bei konstanter Bestrahlungszeit abhängt (Abb. 5). Wenigstens in erster Näherung können wir mit einem, von anderen Arbeiten zur Photomorphogenese her wohlbekannten, *linearen* Zusammenhang zwischen der Meßgröße

und dem Logarithmus der Strahlungsintensität (gestrichelte Kurve) rechnen (vgl. etwa WITHROW u. Mitarb. 1957).

f) Das Wirkungsspektrum. Da die NER, das Reversible HR-DR-Reaktionssystem, zumindest nicht einen entscheidenden Einfluß auf das Längenwachstum des Hypokotyls der *Lactuca*-Keimlinge ausübt, sondern die Steuerung dieses Wachstums offenbar weitgehend auf die HER zurückgeht, müßte ein Wirkungsspektrum der Hemmung des Hypokotylwachstum bei diesen Keimlingen ein relativ „reines" Wirkungsspektrums der HER liefern. Dieses Spektrum müßte mit dem bei *Sinapis alba* herausgearbeiteten, „korrigierten" Wirkungsspektrum der HER weitgehend übereinstimmen, falls es sich tatsächlich um dasselbe photochemische System handelt und falls die „Korrekturen" beim *Sinapis alba*-Spektrum (vgl. MOHR 1959 b) richtig sind.

An sich hatten wir vor, ein möglichst korrektes Wirkungsspektrum (relative Quantenwirksamkeit in Abhängigkeit von der Wellenlänge) auszuarbeiten. Da wir jedoch die neuen Interferenz-Doppellinienfilter (vgl. MOHR und SCHOSER 1960) und damit nur relativ geringe Intensitäten verwenden wollten und da die beobachtete Reaktion etwa dem Logarithmus der eingestrahlten Intensität proportional ist, traten Schwierigkeiten bei der Intensitätsmessung auf, die wir damals nicht befriedigend beheben konnten. Die Energie-Effekt-Kurven bei den einzelnen Wellenlängen sollten wenigstens 4 Meßpunkte umfassen, wenn eine befriedigende Extrapolation möglich sein soll. Eine Abstufung der Intensität in dem wünschenswerten Verhältnis 1:10:100:1000 ließ sich meßtechnisch bei den relativ geringen Maximalintensitäten nicht durchführen.

Wir haben uns deshalb darauf beschränkt, im Bereich des sichtbaren Spektrums bei jeder Wellenlänge mit gleicher Quantenstromdichte eine konstante Zeit zu bestrahlen und die hierbei erhaltenen Meßdaten durch eine Reihe von Parallelversuchen zu sichern. Die verwendete Quantenstromdichte ergab sich aus der maximalen Intensität, die wir — im Hinblick auf eine längere Bestrahlungszeit — bei der kürzesten der verwendeten Wellenlängen ($\lambda = 408$ mμ) erzielen konnten. Die günstigste Dauer der Bestrahlung ergab sich aus Vorversuchen.

Wir gingen in folgender Weise vor: 36 Std nach der Aussaat beginnt die monochromatische Bestrahlung. Die Hypokotyllänge zu diesem Zeitpunkt nennen wir die „Anfangslänge". Es wird 15 Std kontinuierlich bestrahlt. Anschließend kommen die Keimlinge für 9 Std ins Dunkle. 24 Std nach Beginn der Bestrahlung (also 60 Std nach Aussaat) erfolgt die Messung der Hypokotyllänge („Endlänge"). Die Differenz zwischen Anfangs- und Endlänge ist der „Zuwachs". Wir setzen nun den Zuwachs im Dunkeln = 100 und bestimmen, wieviel Prozent Zuwachs bei den verschiedenen Wellenlängen eintritt. Im Wirkungsspektrum tragen wir dann den Faktor: 1000 geteilt durch diesen Prozentsatz (1000/% Zuwachs) in Abhängigkeit von der Wellenlänge auf (Abb. 6). Bei jeder Wellenlänge werden 4—7 Parallelversuche durchgeführt (pro Versuch je 20 Keimlinge, vgl. Methodik). Die entsprechenden Werte von 1000/% Zuwachs der Einzelversuche werden zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammengefaßt, der in dem Wirkungsspektrum angegeben

ist. Einen Eindruck von der Streuung der zum Gesamtmittelwert 1000/% Zuwachs zusammengefaßten Einzelwerte geben die mittleren Fehler dieser Gesamtmittelwerte, die in der Abb. 6 für einige repräsentative Wellenlängen angegeben sind (vgl. die entsprechenden Bemerkungen im Abschnitt Methodik). Das Wirkungsspektrum in Abb. 6 bestätigt uns, daß das Längenwachstum des Hypokotyls der *Lactuca sative*-Keimlinge über die von uns *Sinapis alba* her bekannte HER gesteuert wird. Wir können jedoch nicht mehr feststellen, als daß klare Gipfel im DR und im Blau vorliegen. Über die Feinstruktur des Wirkungsspektrums im

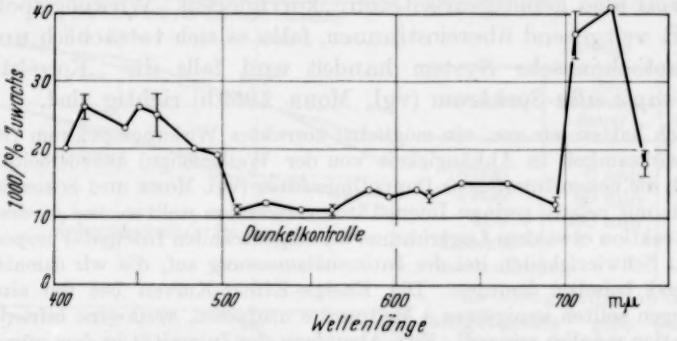


Abb. 6. Ein Wirkungsspektrum für die Hemmung des Hypokotyl-Längenwachstum der Keimlinge von *Lactuca sativa* L. durch sichtbare Strahlung. Bei jeder Wellenlänge wurde 15 Std lang mit konstanter Quantenstromdichte bestrahlt (Intensität der monochromatischen Strahlung bei der Wellenlänge 408 mμ = 500 erg/cm² · sec). Es wurden Interferenz-Doppellinienfilter verwendet. Die Durchführung der Versuche, die Bedeutung von 1000/% Zuwachs und die Bedeutung der bei einigen repräsentativen Wellenlängen eingetragenen Fehlerbereiche sind im Text genauer beschrieben

DR und im Blaubereich läßt sich nichts aussagen. Um in diesem Punkt weiterzukommen, müssen wir mit noch besser geeigneten Objekten und mit kürzeren Bestrahlungszeiten arbeiten.

4. Diskussion

a) Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Keimung der Achänen gewisser „lichtempfindlicher" *Lactuca*-Varietäten gehört zu den am besten untersuchten Reaktionen im Bereich der Photobiologie. Neben der Wirksamkeit des Reversiblen HR-DR-Reaktionssystems (Borthwick u. Mitarb. 1954) ist neuerdings auch hier die Funktion der HER nachgewiesen worden (Hendricks u. Mitarb. 1959). Um so erstaunlicher ist es, daß es offenbar kaum Untersuchungen gibt, die sich im Detail mit dem Einfluß sichtbarer Strahlung auf das Hypokotylwachstum dieser Keimlinge befassen, obgleich natürlich bekannt ist, daß sichtbare Strahlung das Längenwachstum der *Lactuca*-Hypokotyle stark hemmt. Lediglich Flint und Moreland (1939) hatten festgestellt, daß unter ihren Bedingungen das Hypokotylwachstum von *Lactuca*-Keimlingen bei Bestrahlung mit Dunkelrot gehemmt wird, nicht aber

bei Bestrahlung mit den Wellenlängen um 650 oder 850 mμ. Unsere Resultate bestätigen diese frühen Befunde und zeigen, daß das Hypokotylwachstum der *Lactuca sativa*-Keimlinge im wesentlichen über die HER der Photomorphogenese gesteuert wird. In der vorangegangenen Arbeit (Mohr und Noblé 1960) haben wir bereits gezeigt, daß die lichtabhängige Öffnungsbewegung des Plumula-Hakens der *Lactuca*-Keimlinge ebenfalls über die HER gesteuert wird. Die vorliegende Arbeit bestätigt somit die Bedeutung des bei den *Sinapis alba*-Keimlingen erfaßten Blau-DR-Reaktionssystems für die Photomorphogenese der Compositen-Keimlinge.

b) Es gibt nun bereits eine Reihe von wahrscheinlich weitgehend zuverlässigen Wirkungsspektren der HER zwischen 400 und 800 mμ, die seit 1957 an verschiedenen Objekten und unter Benützung verschiedener Reaktionen ausgearbeitet wurden: Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Brassica rapa* und *Brassica rubra* (Siegelmann und Hendricks 1957), Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Sinapis alba* (Mohr 1957), Hypokotylwachstum bei *Sinapis alba* (Mohr 1957), Cotyledonenwachstum bei *Sinapis alba* (Mohr 1959b), Hemmung des Radicula-Wachstums bei *Nemophila insignis* (Hendricks u. Mitarb. 1959), Öffnung des Plumula-Hakens von *Lactuca sativa* (Mohr und Noblé 1960). — Eine Reihe von mehr fragmentarischen Wirkungsspektren, die meist nur den längerwelligen Teil des Wirkungsspektrums der HER betreffen, findet sich bei Siegelman und Hendricks 1958, bei Hendricks und Borthwick 1959a und bei Hendricks u. Mitarb. 1959. Wareing und Black (1958) berichten mehr qualitativ, daß Samen von *Nemophila insignis* (Dunkelkeimer) im Rahmen einer HER durch Blau und DR gehemmt werden. Auch das Wirkungsspektrum der Bioluminescenzhemmung durch Licht bei *Gonyaulax polyedra* (Sweeney u. Mitarb. 1959) gehört vielleicht hierher. — Die mit *Brassica rapa*, *Sinapis alba* und *Lactuca sativa* sorgfältig ausgearbeiteten Wirkungsspektren der HER zeigen eine gute Übereinstimmung und gestatten eine allgemeine Charakterisierung des Wirkungsspektrums der HER: Starker Gipfel im DR, schwächerer Gipfel im Blau, vielleicht Andeutung eines kleinen Gipfels im Hellrot zwischen 600 und 650 mμ. Das in der vorliegenden Arbeit dargestellte Wirkungsspektrum paßt sehr gut in das allgemeine Schema. Die auf Grund der Gipfelpositionen des Wirkungsspektrums geprägte Bezeichnung „Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem" für die HER der Photomorphogenese ist also berechtigt. Ob man die Hochenergie-Wirkungsspektren, die den langwelligen Gipfel im Bereich unterhalb 700 mμ zeigen (Anthocyanbildung bei *Brassica rubra*-Keimlingen und bei Äpfeln, Siegelmann und Hendricks 1957, 1958) mit demselben Photoreaktionssystem in Verbindung bringen kann, erscheint uns fraglich.

c) Es bleibt uns das Problem, wie die experimentellen Fakten zur HER zu deuten sind. Zunächst können wir feststellen, daß es auch

im Rahmen der HER — ganz entsprechend wie bei der NER — zu einer „fundamentalen Umsteuerung" des Stoffwechsels in den Zellen der reagierenden Organe, z. B. von *Sinapis alba* oder *Lactuca sativa*, kommen muß. Wir dürfen annehmen, daß diese „fundamentale Umsteuerung" als Folge einer photochemischen Reaktion in allen Zellen der Pflanze und wohl auch bei den verschiedenen Arten dieselbe ist. Je nach dem „spezifischen Differenziertsein" der Zellen resultiert dann die spezifische Photomorphose. Mit anderen Worten: Es hängt von der genotypisch festgelegten, während der Individualentwicklung der Pflanze ausgebildeten spezifischen Reaktionsfähigkeit ab, ob und in welcher Weise eine Zelle auf ein und dieselbe photochemische Veränderung, die in ihr stattfindet, reagiert.

Uns interessiert nun zunächst vor allem das Problem, welche Vorstellungen man sich hinsichtlich der photochemischen Reaktion der HER machen kann. Ursprünglich hatten Siegelman und Hendricks (1957, 1958) und Mohr (1957) angenommen, daß Cu-Flavoproteide (etwa die Butyryl-Coenzym A-Dehydrase) die wirksame Strahlung im Rahmen der HER absorbieren. Es wurde also eine Enzymaktivierung durch sichtbare Strahlung als Ursache der HER vermutet. Während Mohr (1959c) und Kandeler (1959) auch neuerdings an dieser Deutung festhalten und eine von der NER gänzlich unabhängige Strahlungsaktivierung eines fundamental wichtigen Enzyms für die entscheidende Reaktion im Rahmen der HER halten, schlagen Hendricks und Borthwick (1959a, b) und Hendricks u. Mitarb. (1959) neuerdings eine gänzlich andere Deutung vor.

Nach ihrer Auffassung ist die photochemische Reaktion im Rahmen der HER eine sensibilisierte photochemische Reaktion. Als Sensibilisator (Donator) soll das Reversible HR-DR-Pigmentsystem fungieren, und zwar unter Bestrahlungsbedingungen, unter denen beide Pigmente absorbieren, so daß es zu einem dynamischen Gleichgewicht beider Pigmentformen kommt. Diese Vorstellung sei mit einigen Sätzen erläutert: Wenn wir eine Wellenlänge einstrahlen, die von beiden Pigmenten (P_{HR} und P_{DR}) absorbiert wird, stellt sich zwischen den beiden Pigmenten ein dynamisches Gleichgewicht ein, dessen Lage von der Quantenausbeute der photochemischen Reaktionen in beiden Richtungen abhängt (vgl. hierzu Mohr 1959a). Die Quantenausbeute der Umwandlung in den beiden Richtungen wird von dem Verhältnis der Konzentrationen der Reaktanten bestimmt (Abb. 7), falls man annimmt, daß die Reaktanten im großen Überschuß vorliegen und daß die Assoziationskonstanten für die 4 möglichen Kombinationen von Pigmentmolekülen und Reaktanten dieselben sind, P_{HR} aber nur mit A, P_{DR} nur mit AH_2 reagieren kann. Man kann sich also vorstellen, daß Konzentrationen der Reaktanten vorliegen, bei denen die Quantenausbeute der Umwandlung in der einen oder in der anderen Richtung sehr viel kleiner als 1 ist, so daß

die Pigmentmoleküle mehrmals angeregt werden können, ohne daß eine Umwandlung erfolgt. HENDRICKS u. Mitarb. nehmen auf der Basis dieser Überlegung an, daß unter Hochenergie-Bedingungen, die einen stationären Zustand des Pigmentsystems zulassen, ein beträchtlicher Teil der Anregungsenergie des P_{HR} bzw. P_{DR} nicht für die Umwandlung der Pigmente im Sinn der Abb. 7 verwendet werden kann, sondern für die Auslösung anderer photochemischer Reaktionen zur Verfügung steht.

Es erscheint recht unwahrscheinlich, daß P_{HR} bzw. P_{DR} in andere photochemische Reaktionen als die Umwandlung eintreten, denn das Reversible HR-DR-Pigmentsystem pflegt auch nach längerer Hochenergie-Bestrahlung noch voll zu funktionieren; die Quantität der Pigmente dürfte sich also nicht wesentlich geändert haben. Da es auch

$$P_{HR} + A \underset{\text{Dunkelrot}}{\overset{\text{Hellrot}}{\rightleftharpoons}} P_{DR} + AH_2$$

Abb. 7. Eine allgemeine Formel für das Reversible Hellrot-Dunkelrot-Pigmentsystem unter der Voraussetzung, daß es sich in beiden Richtungen um eine bimolekulare Reaktion handelt. P_{HR} bzw. P_{DR} sind die Pigmentmoleküle, A bzw. AH_2 sind die oxydierenden bzw. reduzierenden Reaktanten. (Verändert nach HENDRICKS und BORTHWICK 1959b)

unwahrscheinlich ist, daß P_{HR} bzw. P_{DR} Photooxydationen sensibilisieren, bleibt also lediglich die Vorstellung, daß P_{HR} bzw. P_{DR} ihre Anregungsenergie übertragen (Sensibilisierung). HENDRICKS und BORTHWICK (1959a) machen die naheliegende Annahme, daß P_{HR} seine Anregungsenergie auf AH_2, P_{DR} auf A übertragen können. Damit wären die Reaktanten in der Lage, mit anderen Molekülen jene photochemischen Reaktionen durchzuführen, deren physiologische Manifestationen wir unter Hochenergiebedingungen beobachten. Da man jedoch zeigen kann, daß bei manchen Reaktionen, etwa bei *Sinapis alba* (vgl. MOHR 1959a, Tabelle 6) auch nach längerer Hochenergiebestrahlung die NER noch ganz ähnlich funktioniert wie bei einer ersten Bestrahlung des Dunkel-Keimlings, ist es sehr wahrscheinlich, daß im allgemeinen die Konzentrationen der Reaktanten und das Verhältnis der Konzentrationen nicht erheblich geändert werden. Man muß daher annehmen, daß die Anregungsenergie der Pigmentmoleküle nicht auf die Reaktanten, sondern auf andere Moleküle übertragen wird (B bzw. D bei HENDRICKS und BORTHWICK 1959b).

d) Die Vorstellungen von HENDRICKS u. Mitarb. erscheinen zunächst recht plausibel. Sie machen es z. B. verständlich, daß etwa im Fall der Anthocyanbildung die langwellige Gipfelposition des Wirkungsspektrums der HER bei den verschiedenen Objekten variiert und es sich doch um dieselbe Reaktion handelt (HENDRICKS und BORTHWICK 1959b). Auch die frappante Übereinstimmung im Verlauf der langwelligen Aktionsbande der HER und der Aktionsbande der Reversibilisierung im Rahmen der NER, die wir etwa bei *Sinapis alba*, *Lactuca sativa* oder *Brassica*

rapa beobachten, können wir uns mit der Annahme leicht verständlich machen, daß das Verhältnis $[A]/[AH_2]$ sehr viel größer als 1 ist.

Wir haben jedoch immer wieder Beobachtungen gemacht, die es uns geraten erscheinen lassen, die geistvolle und elegante Hendrickssche Hypothese auch weiterhin sorgfältig auf ihre Anwendbarkeit zu prüfen. Einige dieser Beobachtungen seien kurz erwähnt:

1. Bei *Sinapis alba*-Keimlingen liegt der langwellige Gipfel der HER um 725—730 mμ (Mohr 1957, 1959a, b). Der Verlauf des Wirkungsspektrums im längerwelligen Bereich ist dem sehr ähnlich, den Siegelmann und Hendricks (1957) für die Anthocyansynthese bei *Brassica rapa*-Keimlingen unter Hochenergie-Bedingungen angegeben haben. Die Deutung der Kurve für *Brassica rapa* (Hendricks und Borthwick 1959b, Abb. 1, unten) müßte also auch für *Sinapis alba* zutreffen. Man müßte demgemäß für *Sinapis* erwarten, daß die Umwandlung von P_{DR} nach P_{HR} mit sehr viel geringerer Quantenausbeute abläuft als die von P_{HR} nach P_{DR}. Dies ist nach unseren Ergebnissen weder vor noch nach einer Hochenergiebestrahlung mit DR der Fall (Mohr 1959a, b). Ähnlich wie die experimentellen Befunde mit *Sinapis alba* stimmen — nach unserer Auffassung — auch die von Hendricks u. Mitarb. (1959) dargestellten Resultate für die Wirksamkeit von HER und NER bei der Keimung von *Lactuca sativa* var. Great Lakes nicht mit den theoretischen Erwartungen überein.

2. Weder bei der Anthocyanbildung der Äpfel (Siegelman und Hendricks 1958) noch bei der Anthocyanbildung der *Brassica rapa*-Keimlinge (Siegelman und Hendricks 1957) ließ sich eine Wirksamkeit der NER nachweisen, d. h. es ist keineswegs sicher, daß das Reversible HR-DR-Pigmentsystem überhaupt in den betreffenden Geweben, die eine ausgeprägte HER zeigen, vorliegt.

3. Wenn man im Rahmen der Hendrickssehen Hypothese von der wahrscheinlichen Annahme ausgeht, daß der HER eine bestimmte sensibilisierte photochemische Reaktion zugrunde liegt (etwa $BH_2 + D \rightarrow B + DH_2$, vgl. Hendricks und Borthwick 1959b, S. 188) muß man weiter annehmen, daß beide Pigmente (also sowohl das angeregte P_{HR} als auch das angeregte P_{DR}) ihre Anregungsenergie auf dieselbe Verbindung übertragen. Dies ist zwar physikalisch-chemisch nicht unmöglich, stellt aber eine neue, gänzlich unbewisene Annahme dar.

4. Wenn wir der Hendrickssschen Hypothese folgen, müßten wir eine ziemlich effektive Energieübertragung von P_{HR} bzw. P_{DR} auf den Acceptor annehmen. Die Energieübertragung dürfte wohl eine Resonanzübertragung sein. Soll diese effektiv erfolgen, müssen die Fluorescenzspektren von P_{HR} bzw. P_{DR} und das Absorptionsspektrum des Acceptors sich beträchtlich überlappen (vgl. z. B. Förster 1951 oder Reid 1957). Daraus würde folgen, daß der Acceptor wohl im Bereich um 750 bis

900 mμ einen Absorptionsgipfel besitzt und bei Einstrahlung dieser Wellenlängen direkt angeregt würde. Nach den bisherigen experimentellen Erfahrungen liegt jedoch in diesem Bereich und auch bei längeren Wellenlängen keine Aktionsbande mehr vor.

Die eben skizzierten Einwände sollen nur kurz begründen, weshalb wir bei der Übernahme der Hendrickssschen Vorstellungen zurückhaltend sein müssen. Unsere nächste Aufgabe wird sein, die Gültigkeit der Hendrickssschen Theorie an sorgfältig ausgesuchten Reaktionen zu prüfen. Mit Hilfe der *Sinapis alba*-Keimlinge z. B. müßte man bei geeigneter experimenteller Anordnung entscheiden können, ob die Hendrickssche Vorstellung tatsächlich möglich ist oder nicht.

Summary

Hypocotyl lengthening of Lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L., Grand Rapids, tip burn resistant strain) is barely influenced by red radiation. That is, control of hypocotyl lengthening *via* the "reversible red, far-red system ("low energy reaction") is negligible in these seedlings.

On the other hand, white, blue and far-red light strongly inhibit hypocotyl lengthening in these seedlings. Studies on the growth rate under various conditions of radiation and the action spectrum of the inhibition of hypocotyl lengthening by visible radiation clearly show, that hypocotyl lengthening in lettuce seedlings is controlled by the "blue, far-red reaction system" ("high energy reaction") which has been demonstrated during recent years to be involved in photomorphogenesis of plants under conditions of irradiation which are comparable with natural conditions.

The action spectrum shows strong peaks in the far-red and in the blue range of the visible spectrum. Action in the green, yellow and red part of the spectrum is negligible.

A hypothesis concerning the "high energy reaction", recently presented by HENDRICKS and co-workers, is critically discussed. It is shown that the hypothesis does not agree in a satisfactory way with all available experimental facts.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchten wir auch an dieser Stelle für ihre Hilfe danken.

Literatur

BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS, E. H. TOOLE and V. K. TOOLE: Action of light on lettuce-seed germination. Bot. Gaz. **115**, 205—225 (1954).

DOWNS, R. J.: Photoreversibility of leaf and hypocotyl elongation of dark grown red kidney bean seedlings. Plant Physiol. **30**, 468—473 (1955).

FLINT, L. H., and C. F. MORELAND: Response of lettuce seedlings to 7600 Å radiation. Amer. J. Bot. **26**, 231—233 (1939).

FÖRSTER, T.: Fluoreszenz organischer Verbindungen. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht 1951.

Hendricks, S. B., and H. A. Borthwick: Photocontrol of plant development by the simultaneous excitations of two interconvertible pigments. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 344—349 (1959a).

Hendricks, S. B., and H. A. Borthwick: Photocontrol of plant development by the simultaneous excitation of two interconvertible pigments. II. Theory and control of anthocyanin synthesis. Bot. Gaz. **120**, 187—193 (1959b).

Hendricks, S. B., E. H. Toole, V. K. Toole and H. A. Borthwick: Photocontrol of plant development by the simultaneous excitations of two interconvertible pigments. III. Control of seed germination and axis elongation. Bot. Gaz. **121**, 1—8 (1959).

Kandeler, R.: Über die Lichtabhängigkeit der Anthocyanbildung. Ber. dtsch. bot. Ges. **71**, (24)—(25) (1959).

Lockhart, J. A., and V. Gottschall: Growth responses of Alaska pea seedlings to visible radiation and gibberellic acid. Plant Physiol. **34**, 460—465 (1959).

Mohr, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypokotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Sinapis alba* L. (= *Brassica alba* Boiss.). Planta (Berl.) **49**, 389—405 (1957).

Mohr, H.: Der Lichteinfluß auf die Haarbildung am Hypokotyl von *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 109—124 (1959a).

Mohr, H.: Der Lichteinfluß auf das Wachstum der Keimblätter bei *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 219—245 (1959b).

Mohr, H.: The photochemical control of anthocyanin synthesis and correlated photomorphogenesis in dark-grown seedlings of *Sinapis alba* L. Proc. IX. Intern. Bot. Congr., vol. II, p. 267—268, Montreal 1959c.

Mohr, H.: Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. Teil I. Ergebn. Biol. **22**, 67—107 (1960).

Mohr, H., u. A. Noblé: Die Steuerung der Schließung und Öffnung des Plumula-Hakens bei Keimlingen von *Lactuca sativa* durch sichtbare Strahlung. Planta (Berl.) (1960, im Druck).

Mohr, H., u. I. Pichler: Der Einfluß hellroter und dunkelroter Strahlung auf die geotropische Reaktion der Keimlinge von *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **55**, 57—66 (1960).

Mohr, H., u. G. Schoser: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta (Berl.) **53**, 1—17 (1959).

Mohr, H., u. G. Schoser: Eine mit Xenonbögen ausgerüstete Interferenzfilter-Monochromatoranlage für kurzwellige sichtbare und langwellige ultraviolette Strahlung. Planta (Berl.) **55**, 143—152 (1960).

Reid, C.: Excited states in chemistry and biology. London: Butterworths Scientific Publ. 1957.

Siegelman, H. W., and S. B. Hendricks: Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings. Plant Physiol. **32**, 393—398 (1957).

Siegelman, H. W., and S. B. Hendricks: Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. Plant Physiol. **33**, 185—190 (1958).

Sweeney, B. M., F. T. Haxo and J. W. Hastings: Action spectra for two effects of light on luminiscence in *Gonyaulax polyedra*. J. gen. Physiol. **43**, 285—299 (1959).

Wareing, P. F., and M. Black: Similar effects of blue and infra-red radiation on light-sensitive seeds. Nature (Lond.) **181**, 1420—1421 (1958).

Withrow, R. B., W. H. Klein and V. Elstad: Action spectra of photomorphogenic induction and its photoinactivation. Plant Physiol. **32**, 453—462 (1957).

Prof. Dr. H. Mohr,
Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9/11

Planta 55, 451—460 (1960)

Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Erwin Baur-Institut, Köln-Vogelsang

ÜBER DIE FRAKTIONIERUNG DES PROTOPLASMAS VON *PHASEOLUS*-ARTEN UND *PHASEOLUS*-ARTBASTARDEN

Von

PAUL SCHWARZE

(Eingegangen am 3. August 1960)

Chemisch-physiologische Untersuchungen an Bastarden zwischen *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus coccineus* haben ergeben, daß sich Stoffwechsel und chemischer Aufbau normaler und gestörter Bastarde in einer Reihe von Merkmalen unterscheiden und daß auch charakteristische Unterschiede zwischen den Bastarden einerseits und den Elternarten andererseits bestehen (SCHWARZE 1954, 1959 und unveröffentlichte Versuche).

In der vorliegenden Arbeit wird über die Fraktionierung des Plasmas der Bastarde und der Elternarten durch Differentialzentrifugierung und über Ergebnisse von Nucleinsäure- und Eiweißbestimmungen in den Fraktionen berichtet. Mit diesen Untersuchungen sollte die Frage beantwortet werden, ob die in den Bastarden enthaltenen Coccineus-Kernanteile das Verhältnis der Fraktionen des Vulgaris-Plasmas abändern und die in früheren Versuchen festgestellten Besonderheiten des Stoffwechsels der Bastarde damit in Zusammenhang stehen. Die durch das Zentrifugieren trennbaren Plasmafraktionen sind Träger von Reaktionssystemen, deren Zusammenspiel den Gesamtstoffwechsel der Zelle ergibt.

Material

Für die Untersuchungen wurden die folgenden unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus kultivierten Pflanzen benutzt:

Phaseolus vulgaris, Sorte „Abessinische Auslese", Nr. 3810;

Phaseolus coccineus, Selbstungslinien der Sorte „Weiße Riesen";

Bastarde beider Arten mit *Phaseolus vulgaris* als Mutter.

Alle Pflanzen wurden wiederum von Herrn Prof. W. RUDORF freundlicherweise aus seinem Material zur Verfügung gestellt.

Methoden

Blatthomogenate wurden fraktioniert zentrifugiert. In den Überständen — nicht in den Sedimenten — wurden der Nucleinsäure- und Eiweißgehalt bestimmt und aus den Differenzen der Eiweiß- und Nucleinsäuregehalt der Fraktionen errechnet. Die Differenzmethode gestattet sicherlich *keine scharfe quantitative Trennung*, eine solche dürfte aber mit der umständlicheren Analyse der Sedimente ebenfalls nicht

zu erzielen sein. Die Sedimente müßten erneut suspendiert und zentrifugiert werden, wobei infolge der Labilität der Fraktionen Fehler in die Analyse hineingetragen werden, welche die der Differenzmethode wahrscheinlich übertreffen. Das Eiweiß wurde zum Teil mit Hilfe der Kjeldahl-Methode, zum Teil mit Hilfe der Biuret-Reaktion (SCHWARZE 1951), die Nucleinsäure durch Messung der UV-Absorption bei 260 mμ in Anlehnung an das Verfahren von OGUR und ROSEN (1950) bestimmt:

Je 5 g frische, ausgewachsene Blätter wurden mit insgesamt 50 ml 0,88 m Saccharoselösung im Bühler-Homogenisator zerkleinert (30 sec bei Stufe 12). Das Rohhomogenat wurde durch ein Baumwolltuch geseiht und der Rückstand mit der Hand leicht ausgedrückt. Vom Homogenat wurden je 8 ml in Kunststoffzentrifugenbecher abgenommen. Bei 1000 g (30 min) wurden im wesentlichen Kerne und Chloroplasten, bei 24000 g (40 min) die Mitochondrien, bei 40000 g (120 min) die Mikrosomen und bei 250000 g (30 min) die hochmolekularen Anteile des Grundplasmas sedimentiert. Nach jeder Stufe wurde ein Gläschen aus der Zentrifuge entnommen. Vom Überstand einer jeden Fraktion (F_1 bis F_4) sowie der Ausgangssuspension (F_a) wurden 5 ml in einen Zentrifugenbecher aus Glas abpipettiert. Alle diese Arbeiten — Homogenisieren, Füllen der Zentrifugenbecher, Zentrifugieren usw. — wurden bei einer Temperatur zwischen 0 und +3° C durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Fraktionen für die Nucleinsäure- und Eiweißbestimmung und die Durchführung der Bestimmungen geschahen in der folgenden Weise.

1. Ausfällung von Eiweiß und Nucleinsäure, Entfernung alkohollöslicher Stoffe: Zugabe von 20 ml heißem Alkohol (96%, vergällt mit Petroleumbenzin), Gläschen 2 min in siedendes Wasser einstellen, Niederschlag abzentrifugieren, Überstand abgießen.

2. Entfernung von Lipoiden: Rückstand mit 15 ml Äther-Alkohol (1:3) 2 min im Wasserbad erhitzen, abkühlen lassen, zentrifugieren, Überstand abgießen. Diesen Prozeß dreimal wiederholen.

3. Entfernung störender, in verdünntem Alkohol löslicher Stoffe: Rückstand zweimal mit je 10 ml 70%igem vergälltem Alkohol extrahieren.

4. Entfernung säurelöslicher Stoffe: Rückstand zweimal mit je 3 ml 0,2 m kalter $HClO_4$ extrahieren.

5. Extraktion und Bestimmung der Nucleinsäure: Rückstand mit 10 ml 0,5 m $HClO_4$ $^1/_2$ Std im Wasserbad auf 70° erhitzen. Nach Abkühlen zentrifugieren, Überstand abgießen und in diesem Absorption bei 260 mμ bestimmen oder Absorptionskurve zwischen 200 und 320 mμ aufnehmen.

6. Extraktion und Bestimmung des Eiweißes: Unlöslichen Rückstand durch Zentrifugieren und Absaugen[1] quantitativ vom Überstand abtrennen und mit 4 ml Natronlauge (2%ig) und 0,25 ml Kupfersulfatlösung (10%ig) versetzen. Nach 12stündigem Stehen (über Nacht) zentrifugieren und Überstand im Photometer bei 550 mμ messen.

Nucleinsäure- und Eiweißgehalt wurden mit Hilfe der Beziehungen $NS = e_{260\,m\mu} \times 0{,}128$ bzw. $E = e_{550\,m\mu} \times 4{,}448$ berechnet[2]. Aus dem NS-

[1] Der Niederschlag sitzt nach dem Zentrifugieren nicht so fest am Boden, daß sich der Überstand vollständig abgießen läßt. Die Restlösung wurde deshalb mit einer Vollpipette, auf deren Spitze ein Stückchen Filtrierpapier aufgelegt war — es wird durch den Sog festgehalten — an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das mit Partikeln des Niederschlages behaftete Papier wurde dem Rückstand beigegeben.

[2] Die Relation zwischen Extinktion und NS- bzw. Eiweißgehalt wurde mit Hilfe von Ribonucleinsäure- und Edestinlösungen bekannter Konzentration ermittelt. Die Faktoren haben für die verwendeten Mengen (6 g Ausgangsmaterial, 50 ml Saccharoselösung, aliquote Teile von je 5 ml für die Bestimmungen) und Messungen bei 0,5 cm Schichtdicke Gültigkeit.

und Eiweißgehalt der Lösungen F_a und F_1 bis F_4 ergaben sich die auf die Plasmafraktionen entfallenden Anteile (NS- bzw. Eiweißgehalt der Plasmafraktionen von 100 g Blattfrischsubstanz:

$F_a - F_1 =$ I („Kerne + Chloroplasten")
$F_1 - F_2 =$ II („Mitochondrien")
$F_2 - F_3 =$ III („Mikrosomen")
$F_3 - F_4 =$ IV („hochmolekulares Grundplasma")
$F_4 =$ V („niedrigmolekulares Grundplasma").

Die Werte geben die Relation zwischen den Fraktionen wieder, absolut gesehen sind sie mit kleinen Fehlern behaftet, da sich der Wassergehalt der Blätter nicht genau in Rechnung setzen läßt und das Seihen des Rohhomogenats zu unkontrollierbaren Verlusten führt. Doch dürfte es dabei nicht zu einer Verfälschung des Verhältnisses der Fraktionen kommen, auf dessen Ermittlung es in dieser Arbeit in erster Linie ankommt.

Für die Zuverlässigkeit der Methoden spricht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die NS-Extrakte ergeben typische NS-Absorptionskurven, bei denen lediglich das Absorptionsminimum geringe Abweichungen zeigen kann (Verschiebung nach dem langwelligen Teil des Spektrums, Anhebung des Minimums im Vergleich zum Absorptionsmaximum). Die „Biuretlösungen" sind rein violett gefärbt, und auch die Absorption um 550 mμ läßt keine Beimengungen störender Stoffe erkennen.

Ergebnisse

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen lassen sich, wenn man von der Fraktion I des gestörten Bastards absieht, keine gesicherten Unterschiede zwischen den verschiedenen partikulären Fraktionen feststellen. Es wird deshalb zunächst nur je ein charakteristisches Beispiel für die Elternarten und die beiden Bastardformen, normal entwickelter und gestörter Typ, mitgeteilt (Tabelle 1). Eine Stellungnahme zu diesen Befunden sowie den Ergebnissen der Fraktionierung des Grundplasmas, die zur Zeit durch weitere Untersuchungen ergänzt werden, erfolgt später.

Unterschiede zeigen sich jedoch, wenn die Partikel- und die Grundplasmafraktionen jeweils zusammengefaßt und die Quotienten Partikel-Nucleinsäure/Grundplasma-Nucleinsäure (NS_P/NS_G) und Partikel-Eiweiß/Grundplasma-Eiweiß (E_P/E_G) gebildet werden. Beide Quotienten sind bei *Phaseolus coccineus* höher als bei *Phaseolus vulgaris*. Dieser augenfällige Unterschied hat sich bei allen in Tabelle 2 zusammengefaßten Trennungen ergeben.

Bei den normalen Bastarden entspricht der Quotient E_P/E_G etwa dem von *Phaseolus coccineus*, der Quotient NS_P/NS_G hingegen liegt dem Wert des mütterlichen Elters nahe. Die Grundplasmafraktion ist beim

Tabelle 1. *Fraktionierung des Plasmas von Phaseolus vulgaris, Phaseolus coccineus und Phaseolus vulgaris × Phaseolus coccineus*

Die Fraktionen enthalten *im wesentlichen* folgende Bestandteile: I = Kerne + Chloroplasten, II = Mitochondrien, III = Mikrosomen, I bis III = gesamte Plasmapartikeln, IV = hochmolekulares Grundplasma, V = niedrigmolekulares Grundplasma, IV bis V = gesamtes Grundplasma, I bis V = gesamtes Protoplasma. Alle Werte sind auf Frischsubstanz bezogen.

Fraktion Nr.	*Phaseolus vulgaris*		*Phaseolus coccineus*		*Phaseolus vulgaris* × *Phaseolus coccineus* normal		gestört	
	Nucleinsäure %	Eiweiß %	Nucleinsäure %	Eiweiß %	Nucleinsäure %	Eiweiß %	Nucleinsäure %	Eiweiß %
I	0,0320	1,892	0,0305	0,760	0,0436	1,112	0,0300	0,151
II	0,0122	0,300	0,0196	0,364	0,0128	0,293	0,0122	0,244
III	0,0032	0,042	0,0166	0,039	0,0083	0,090	0,0045	0,027
I—III	0,0474	1,234	0,0667	1,162	0,0647	1,414	0,0487	0,422
IV	0,0420	0,168	0,0316	0,095	0,0468	0,185	0,0449	0,088
V	0,0340	1,522	0,0154	0,802	0,0526	1,238	0,0398	0,660
IV—V	0,0760	1,690	0,0470	0,897	0,0994	1,423	0,0847	0,748
I—V	0,1234	2,924	0,1137	2,059	0,1641	2,837	0,1334	1,170

Tabelle 2. *Nucleinsäure (NS) und Eiweiß (E) in Plasmapartikeln (P) und Grundplasma (G) in % der Blattfrischsubstanz*

Versuch Nr.	*Phaseolus vulgaris*	*Phaseolus coccineus*	*Phaseolus vulgaris* × *Phaseolus coccineus* normal	gestört
		NS_P/NS_G		
1	0,042/0,106=0.397	0,047/0,026=1,82	0,065/0,099=0,658	0,0487/0,0847=0,58
2	0,047/0,076=0,617	0,067/0,047=1,43	0,051/0,070=0,730	0,0398/0,0611=0,65
3	0,034/0,061=0,558	0,022/0,022=1,00	0,062/0,086=0,713	
4	0,025/0,064=0,391	1,43	0,039/0,057=0,680	
	⌀ =0,49±0,057	⌀ =1,42±0,17	⌀ =0,70±0,016	⌀ =0,62
		E_P/E_G		
1	1,125/2,196=0,512	1,270/1,180=1,075	1,414/1,423=1,00	0,422 /0,748 =0,56
2	1,234/1,690=0,730	[1,559/0,558=2,780]	1,606/1,508=1,06	0,426 /0,829 =0,51
3	0,864/1,227=0,703	0,676/0,543=1,250	1,850/1,619=1,15	
4	0,885/1,147=0,770	1,162/0,898=1,300	1,330/0,974=1,37	
5	1,162/2,060=0,565	1,360/1,090=1,250		
	⌀ =0,65±0,057	⌀ =1,22±0,18	⌀ =1,15±0,081	⌀ =0,54

normalen Bastard bezogen auf Nucleinsäure und im Vergleich zu *Phaseolus vulgaris* also relativ arm an Eiweiß oder bezogen auf Eiweiß relativ reich an Nucleinsäure.

Bei den gestörten Bastarden weisen alle Fraktionen etwa denselben Nucleinsäure-, jedoch einen niedrigeren Eiweißgehalt als bei den Elternarten und den normalen Bastarden auf (Tabelle 1). Ganz besonders stark ist die Reduktion des Eiweißgehaltes in der Fraktion I („Kerne und

Chloroplasten"); sie dürfte mit der mangelhaften Ausbildung der Chloroplasten, die für die gestörten Bastarde charakteristisch ist, zusammenhängen. Die Quotienten NS_P/NS_G und E_P/E_G entsprechen in der Größenordnung denen von *Phaseolus vulgaris* (Tabelle 2). Diese Merkmale finden sich bei den Folgeblättern der gestörten Bastarde, in schwächerer Ausprägung treten sie auch bei den weniger gestörten Primärblättern auf, hier sind insbesondere die Quotienten NS_P/NS_G und E_P/E_G denen der normalen Bastarde angeglichen.

Um festzustellen, inwieweit das Verhältnis der Plasmafraktionen vom Blattalter abhängt, wurden junge und ältere Blätter miteinander verglichen (Tabelle 3). Bei ersteren besaßen die Einzelblätter eine

Tabelle 3. *Fraktionierung des Protoplasmas junger und alter Blätter von Phaseolus coccineus. Nucleinsäure und Eiweiß sind auf Frischsubstanz bezogen*

Fraktion Nr.	% Nucleinsäure		% Eiweiß		Nucleinsäure/Eiweiß	
	Junge Blätter	Alte Blätter	Junge Blätter	Alte Blätter	Junge Blätter	Alte Blätter
I	0,1282	0,0305	0,667	0,760	1/5,2	1/25
II	0,0482	0,0196	0,467	0,364	1/9,7	1/18,6
III	0,0835	0,0166	0,258	0,039	1/3,1	1/2,4
I—III	0,2599	0,0670	1,392	1,163	1/5,4	1/14,4
IV	0,2694	0,0316	0,209	0,095	1/0,8	1/3,1
V	0,2404	0,0154	1,780	0,802	1/7,4	1/52
IV—V	0,5098	0,0468	1,989	0,897	1/3,9	1/19,2
I—V	0,7697	0,1138	3,381	2,059	1/4,4	1/18,1

Länge von 2—3,5, bei letzteren eine Länge von 9—12 cm. Der Alters- und Entwicklungsunterschied beider Stadien ist also beträchtlich. Mit dem Wachstum der Blätter geht bei Bezug auf Frischsubstanz eine Abnahme des Nucleinsäure- und mit Ausnahme der Fraktion I auch eine Abnahme des Eiweißgehaltes einher. Diese starke Abnahme dürfte in erster Linie durch die relativ stärkere Vermehrung von Kohlenhydraten, Wasser u. a., die sich während der Entwicklung vollzieht, bedingt sein. Das abweichende Verhalten der Fraktion I ist wohl mit der starken Entwicklung der Chloroplasten, mit der das Blattwachstum einhergeht, zu erklären.

Sehr augenfällig ist, bezogen auf Nucleinsäure, die Zunahme des Eiweißanteiles in allen Fraktionen mit Ausnahme der Fraktion III („Mikrosomen") und die Verschiebung der Quotienten NS_P/NS_G und E_P/E_G, die sich also erst im Laufe der Entwicklung auf den in ausgewachsenen Blättern von *Phaseolus coccineus* beobachteten Wert einspielen. Bei jungen Blättern ist relativ mehr Nucleinsäure im Grundplasma, bei alten hingegen mehr Nucleinsäure in den Partikeln enthalten.

Das gleiche trifft für den Eiweißgehalt der Partikel- und Grundplasmafraktion zu.

Die Quotienten NS_P/NS_G und E_P/E_G stimmen in jedem Fall nicht genau, sondern nur größenordnungsmäßig überein. Da auch der Gesamtnucleinsäure- und der Gesamteiweißgehalt in den einzelnen Versuchen stark variieren, wurden diese mit den zugehörigen Quotienten verglichen (Tabelle 4 und 5). Es besteht jedoch keine Beziehung zwi-

Tabelle 4. *Gesamt-Nucleinsäure (Ges.NS) und Verhältnis Partikelnucleinsäure/Grundplasmanucleinsäure (NS_P/NS_G) bei Elternarten und normalen Bastarden*

Phaseolus vulgaris		*Phaseolus coccineus*		*Phas. vulg. × Phas. cocc.*	
Ges.NS	$\frac{NS_P}{NS_G}$	Ges.NS	$\frac{NS_P}{NS_G}$	Ges.NS	$\frac{NS_P}{NS_G}$
0,089	1/2,56	0,044	1/1,00	0,096	1/1,47
0,095	1/1,79	0,073	1/0,55	0,121	1/1,40
0,123	1/1,62	0,114	1/0,70	0,148	1/1,37
0,148	1/2,52			0,164	1/1,52

Tabelle 5. *Gesamt-Eiweiß (Ges.E) und Verhältnis Partikeleiweiß/Grundplasmaeiweiß (E_P/E_G) bei Elternarten und normalen Bastarden*

Phaseolus vulgaris		*Phaseolus coccineus*		*Phas. vulg. × Phas. cocc.*	
Ges.E	E_P/E_G	Ges.E.	E_P/E_G	Ges.E.	E_P/E_G
2,032	1/1,30	1,218	1/0,80	2,304	1/0,73
2,091	1/1,42	2,060	1/0,77	2,837	1/1.00
2,924	1/1,37	2,117	1/0,36	3,114	1/0,94
3,222	1/1,77	2,450	1/0,80	3,469	1/0,87
3,321	1/1,95	2,450	1/0,93		

schen den Quotienten und dem Nucleinsäure- bzw. Eiweißgehalt; Eiweiß und Nucleinsäure sind also immer in einem bestimmten, durch die genetische Konstitution und den Entwicklungszustand festgelegten Verhältnis auf Partikeln und Grundplasma verteilt. Findet, mit anderen Worten, Nucleinsäure- oder Eiweißsynthese statt, so bleiben die Quotienten innerhalb gewisser Grenzen gewahrt, was ein Ausdruck dafür sein könnte, daß partikuläre und nichtpartikuläre Fraktionen entsprechend ihren genetisch fixierten Potenzen um die Eiweiß- und Nucleinsäurebausteine konkurrieren.

Besprechung der Ergebnisse

Das Protoplasma der Zelle ist organisiert, d.h. in eine Anzahl von Komponenten — partikuläre und nichtpartikuläre — aufgeteilt. Diese wirken zusammen und konkurrieren, worauf viele Befunde hinweisen, um die der Zelle zugeführten Nährstoffe und um den in der Zelle

verfügbaren Platz. Die Konkurrenzfähigkeit setzt voraus, daß die Komponenten ungesättigt sind, doch müssen die Sättigungsdefizite der Reaktionspartner, der Plasmakomponenten im obigen Sinn, so aufeinander abgestimmt sein, daß ein harmonisches Zusammenspiel gewährleistet ist. Befunde und Überlegungen, die diese Vorstellung stützen, hat unlängst Bogen (1956) zusammengestellt und diskutiert.

Zwischen den verschiedenen Plasmakomponenten besteht auch eine Beziehung derart, daß sie einander mit Baustoffen und Energie versorgen und andererseits sich von ihren Stoffwechselprodukten befreien. Ist ein Organell defekt, so kann es nicht in genügendem Maß Stoffe produzieren, die für Entwicklung und Funktion anderer erforderlich sind, es ist aber auch nicht in der Lage, Stoffe aufzunehmen, deren Beseitigung die Voraussetzung für die normale Funktion der nicht geschädigten Organelle ist.

Wird einer der Partner durch irgendeinen Impuls so gefördert oder gehemmt, daß er in seiner Wirkung und Konkurrenzfähigkeit außerhalb des für das gesamte System tragbaren Spielraumes gerät, werden mehr oder weniger tiefgreifende Veränderungen des Zellstoffwechsels und der Lebensäußerungen der Zelle überhaupt die Folge sein.

Die Anwesenheit von *Phaseolus-coccineus*-Kerngenen hat, wie die Versuche zeigen, Einfluß auf das Verhältnis der Plasmakomponenten der Mutter, das bei völliger Selbständigkeit und Unabhängigkeit mit dem von *Phaseolus vulgaris* identisch sein sollte. Während der Quotient E_P/E_G im normalen Bastard dem von *Phaseolus coccineus* entspricht, ist das Verhältnis NS_P/NS_G dem der Mutter weitgehend angenähert. Das Eiweißbildungsvermögen des Grundplasmas ist beim normalen Bastard bezogen auf seinen Nucleinsäuregehalt also weniger intensiv als bei der Mutter. In der Verschiebung des Verhältnisses E_P/E_G nach dem des Vaters beim normalen Bastard darf vielleicht eine Art Kompensation gesehen werden; denn da, wo sie nicht stattfindet, sondern der Quotient der Mutter erhaltenbleibt, sind die Bastarde mit starken Entwicklungsstörungen — Zwergwuchs, Chlorophylldefekten usw. — behaftet.

Der Eiweißarmut der Fraktion I („Kerne + Chloroplasten") beim gestörten Bastard, offenbar eine Folge der mangelhaften Entwicklung der Chloroplasten, entspricht eine starke Reduktion des Chlorophyllgehaltes. Das Ausbleiben der an diese Organelle gebundenen Chlorophyllbildung und Chlorophyllspeicherung wirkt sich zweifellos auf den gesamten Porphyrinstoffwechsel der Zelle aus. Der Porphyrinring wird sicherlich nicht in den Chloroplasten synthetisiert, sondern diese übernehmen an anderer Stelle gebildetes Porphyrin, vermutlich Protoporphyrin, und wandeln es in einer Reihe von Reaktionsschritten zum Chlorophyll um. Das Stoffwechselprodukt Protoporphyrin steht deshalb

in Zellen mit Chloroplasten- oder Chlorophylldefekten anderen Plasmakomponenten für porphyrinbedürftige Reaktionen, zur Bildung von Katalase, Peroxydase und Cytochromen, zur Verfügung. Eine Anhäufung derartiger Enzyme, z.B. der Peroxydase über die Norm hinaus, wie sie bei den gestörten Bastarden nachgewiesen wurde, dürfte nicht ohne Einfluß auf die Lebensäußerungen der Zelle bleiben.

Die Quotienten NS_P/NS_G und E_P/E_G sind keine statischen, sondern dynamische Merkmale; sie ändern sich während der Entwicklung und hängen, wie Untersuchungen an isolierten verdunkelten Blättern zeigen (SCHWARZE 1960), von der Kohlenhydratversorgung und anderen Bedingungen ab. Spezifisch ist der Gang der Änderung und das endgültige Verhältnis, das sich im Laufe der Entwicklung einspielt. Solche dynamischen Merkmale haben wir auch in den Quotienten NS_P/E_P und NS_G/E_G, die während der normalen Entwicklung eine Abnahme, im isolierten und verdunkelten Blatt eine Zunahme erfahren, vor uns.

Der Stoffwechsel ist das Ergebnis des Zusammenspiels der Plasmakomponenten, deren jede die stoffliche Basis für den geordneten Ablauf einer großen Zahl von Einzelreaktionen darstellt. Die Verschiebung des Verhältnisses der Komponenten — im vorliegenden Fall durch artfremde Kerngene — muß den Stoffwechsel in vielen Einzelzügen abändern, die Ursache wirkt sich also pleiotrop auf den Stoffwechsel und damit auch auf die Komplexe der morphologischen und entwicklungsphysiologischen Merkmale des betreffenden Organismus aus. Je nach Art der Ursache — der Natur der artfremden Gene im vorliegenden Fall- und je nach der Weite des Spielraumes, der dem plasmatischen System für eine Neueinregulierung zur Verfügung steht, werden existenzfähige oder nichtexistenzfähige Reaktionssysteme entstehen. Im ersten Fall zeigen die Individuen mehr oder weniger starke Abänderungen, im letzteren Fall gehen sie früher oder später an einer Disharmonie des Stoffwechsels zugrunde.

Die beobachteten Schwankungen im Nucleinsäure- und Eiweißgehalt laufen bis zu einem gewissen Grad konform, d.h. einem hohen oder niedrigen Nucleinsäuregehalt in den Fraktionen entspricht in der Regel ein hoher bzw. niedriger Eiweißgehalt. Diese Relation besteht bei den Gehaltsänderungen während des Blattwachstums, die allerdings zum wesentlichen Teil als Verdünnungseffekt anzusehen sind, und sie gilt auch für das Absinken des Eiweiß- und Nucleinsäurespiegels im isolierten verdunkelten Blatt. Meist ist der Eiweißgehalt im Vergleich zum Nucleinsäuregehalt den größeren Schwankungen unterworfen. Die vorliegenden Befunde geben keine Antwort auf die Frage, wie Abbau und Synthese beider Stoffe miteinander verknüpft sind. Möglicherweise ist die Relation nur der Ausdruck dafür, daß, wenn die Voraussetzungen für Abbau oder

Synthese hochmolekularer Stoffe gegeben sind, beide Stoffe unabhängig voneinander abgebaut bzw. synthetisiert werden.

Die geschilderten Versuche wurden durchgeführt, um Aufschluß über die Ursachen des unterschiedlichen Stoffwechsels und sonstiger Verschiedenheiten der Bastarde zwischen *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus coccineus* zu erhalten. Wenn die dabei gewonnenen Ergebnisse diese Frage auch noch nicht endgültig beantworten, so vermitteln sie doch weitere Einblicke in den Stoffwechsel der Bastarde. Die Beeinflussung des protoplasmatischen Systems im Sinne einer Abänderung des Verhältnisses seiner Komponenten durch artfremde Kerngene stellt zweifellos ein Ergebnis dar, dessen weitere Analyse lohnenswert sein dürfte.

Zusammenfassung

Es werden Beispiele für die Fraktionierung des Protoplasmas der Blätter von *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus* und *Phaseolus vulgaris* (♀) × *Phaseolus coccineus* (♂) mitgeteilt. Die Zahlen lassen keine sicheren Unterschiede zwischen den entsprechenden partikulären und Grundplasmafraktionen der Elternarten und Bastarde erkennen, doch zeigen sich Differenzen, wenn die Partikel- und Grundplasmafraktionen jeweils zusammengefaßt und die Quotienten Partikel-Nucleinsäure/Grundplasma-Nucleinsäure (NS_P/NS_G) und Partikel-Eiweiß/Grundplasma-Eiweiß (E_P/E_G) gebildet werden. Diese Quotienten liegen bei *Phaseolus vulgaris* niedriger als bei *Phaseolus coccineus*, und bei den nichtgestörten Bastarden stimmt der Quotient E_P/E_G praktisch mit dem von *Phaseolus coccineus* überein, während der Quotient NS_P/NS_G dem des mütterlichen Elters angenähert ist. Die gestörten Bastarde ähneln im Nucleinsäuregehalt den Elternarten und den normalen Bastarden, doch ist in allen Fraktionen, besonders stark in den Chloroplasten, der Eiweißanteil bezogen auf Frischsubstanz und Nucleinsäure vermindert. — Nucleinsäure und Eiweiß nehmen mit der Entwicklung der Blätter ab, dabei wird das Verhältnis Eiweiß/Nucleinsäure, eine Fraktion ausgenommen, stark zugunsten des Eiweißes verschoben, ferner findet eine Verschiebung der Quotienten NS_P/NS_G und E_P/E_G zugunsten der Partikeln statt. Eine Abhängigkeit der Quotienten vom Gesamteiweiß oder der Gesamtnucleinsäure, die beide in den einzelnen Versuchen stark variieren, ist nicht festzustellen. Die Befunde zeigen, daß die in den Bastarden enthaltenen Kerngene von *Phaseolus coccineus* das Verhältnis der Plasmakomponenten der Mutter, das bei völliger Unabhängigkeit und Selbständigkeit mit dem von *Phaseolus vulgaris* übereinstimmen müßte, wesentlich beeinflussen. Sie werden unter dem Gesichtspunkt der Konkurrenzbeziehungen zwischen den Plasmakomponenten, deren Zusammenspiel den Stoffwechsel der Zelle ergibt, diskutiert.

Literatur

Bogen, H. J.: Die Koordination der Reaktionssysteme. In W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 607—631. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

Ogur, M., and G. Rosen: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. **25**, 262—276 (1950).

Schwarze, P.: Über eine Serienmethode zur photometrischen Reineiweißbestimmung in Pflanzenmaterial. Z. Züchtung **30**, 300—308 (1951).

Schwarze, P.: Beziehungen zwischen Peroxydasereaktion, Eiweißspiegel und Chlorophyllbildung. Planta (Berl.) **44**, 491—502 (1954).

Schwarze, P.: Untersuchungen über die Flavonoidproduktion in Phaseolus-Artbastarden (*Phaseolus vulgaris* × *Phaseolus coccineus*). Planta (Berl.) **54**, 152—161 (1959).

Schwarze, P.: Über den Einfluß der Verdunklung auf die Plasmafraktionen isolierter Blätter. Planta (Berl.) **55**, 461 (1960).

Dr. P. Schwarze,
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin Baur-Institut),
Köln-Vogelsang

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigung bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Vorläufige Mitteilungen werden nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellungen der Tatbestände ist zulässig.

II. Formelle Anforderungen

Originalarbeiten sollen nicht umfangreicher als zwei Druckbogen (à 16 Druckseiten) sein; Kurze Mitteilungen dürfen den Umfang von vier Druckseiten nicht überschreiten.

Das Manuskript muß leicht leserlich und einseitig geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzureichen, ebenso die Legenden. Die Arbeiten müssen knapp und sprachlich klar geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. *Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen* (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) *herzustellen.*

Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

Für die Rechtschreibung ist die „wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt.

Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch nach freier Wahl des Autors abgefaßt sein kann. Inhaltsverzeichnisse können nicht abgedruckt werden.

Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text, oder wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen und angefordert werden kann.

Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige zu beschränken. Knappe Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle *und* Kurve. Für Halbtonbilder (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind reproduktionsfähige, d.h. scharfe, gut durchgezeichnete und tonwertreiche Vorlagen (Hochglanzabzüge) einzureichen. Die Beschriftung der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise sind auf einem über die Vorlage geklebten Deckblatt einzureichen. Für schematische Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzungen reproduziert werden sollen, sind saubere, klare Skizzen abzuliefern, die vom Verlag umgezeichnet werden.

Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen (jeweils mit Anfangsbuchstaben des Vornamens) *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Autorennamen sollen (für KAPITÄLCHEN-Druck) doppelt, lateinische Namen der Objekte (für *Kursiv*-Druck) geschlängelt unterstrichen werden. In Kursiv-Druck können auch andere Worte des Textes gesetzt werden, die der Autor besonders hervorzuheben wünscht.

Das Zerlegen der Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.

Danksagungen können in Form von Fußnoten zum Beitragstitel oder als kurzer Petitabschnitt am Schluß der Arbeit gebracht werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

In der Korrektur sollen nur Druckfehler verbessert, jedoch keine inhaltlichen oder stilistischen Änderungen vorgenommen werden. 10% der Satzkosten übersteigende Korrekturkosten müssen den Autoren in Rechnung gestellt werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Vor kurzem erschien:

Tiere als Mikrobenzüchter

Von Dr. PAUL BUCHNER,
em. Professor an der Universität München

(Verständliche Wissenschaft, Naturwissenschaftliche Abteilung, herausgegeben von Professor Dr. KARL VON FRISCH, München. Fünfundsiebzigster Band)

Mit 102 Abbildungen. VIII, 160 Seiten Kl.-8°. Ganzleinen DM 8,80

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung · Entdeckung und Verbreitung der Endosymbiosen: Endosymbiosen mit Algen. Endosymbiosen mit Bakterien und niederen Pilzen · Temporäre Endosymbiosen bei pilzzüchtenden Insekten · Die Gärkammern Holz und Moder fressender Insektenlarven · Die Flagellatensymbiose im Termitendarm · Die erblichen Endosymbiosen mit Bakterien und Pilzen: Die Lokalisation der Symbionten (Die Symbionten im Darm und in seinen Anhangsorganen. Die Überwindung der Schranke des Darmepithels. Symbionten im Bereich der Leibeshöhle. Der Sitz der Leuchtsymbionten). Die Wege der Übertragung (Die schlüpfenden Larven infizieren sich mit dem Ei äußerlich beigegebenen Symbionten. Die Eizellen werden im mütterlichen Körper infiziert. Die Heranzucht spezifischer Übertragungsformen. Infektion von Embryonen im mütterlichen Körper). Embryonalentwicklung und Symbiose. Vom Sinn des Zusammenlebens. Zur Stammesgeschichte der Endosymbiosen · Sachverzeichnis.

ZUR INFORMATION

Daß Mikroben in wissenschaftlichen Instituten auf künstlichen Nährböden gezüchtet werden, ist allgemein bekannt. Aber daß Tausende von Insektenarten in ihrem Körper eine Brutanstalt für gewisse Bakterien oder Pilze beherbergen, mit denen sie eine enge Lebensgemeinschaft eingegangen sind und deren Übertragung von Generation zu Generation auf erstaunlichen Wegen gesichert ist, davon ist wenig bekannt, und auch die Gelehrten wußten davon vor 50 Jahren noch so gut wie nichts. Seither ist auf diesem Gebiet — fast ausschließlich durch Prof. BUCHNER und seine Schule — so viel Merkwürdiges entdeckt worden, daß die zusammengefaßten Ergebnisse ein fast 800 Seiten starkes Werk füllen. Das Interessanteste davon wird in dem vorliegenden Bändchen in anregender Form dem Laien vorgetragen und durch ausgezeichnete Bilder anschaulich gemacht.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany